



(51) 国際特許分類 <b>C12N 15/86, A61K 48/00, A01K 67/027,          C12N 7/00</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO00/01837</b>  (43) 国際公開日 2000年1月13日(13.01.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03552  (22) 国際出願日 1999年7月1日(01.07.99)  (30) 優先権データ 特願平10/204333      1998年7月3日(03.07.98)      JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JP) 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 福村正之(FUKUMURA, Masayuki)(JP/JP) 長谷川護(HASEGAWA, Mamoru)(JP/JP) 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP) 浅川 誠(ASAKAWA, Makoto)(JP/JP) 〒561-0825 大阪府豊中市二葉町3-2-1 シオノギ神崎川寮319号室 Osaka, (JP)		(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)  (81) 指定国    AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title:    (-)-STRAND RNA VIRUS VECTOR FOR NERVE CELL  (54)発明の名称    神経細胞用 (-) 鎖RNAウィルスベクター  (57) Abstract A (-)-strand RNA virus vector for transferring a gene into nerve cells which makes it possible to efficiently transfer a gene into nerve cells including the central nervous system tissues in gene therapy, etc.		

(57)要約

(一)鎖RNAウイルスベクターを用いることにより、神経細胞へ核酸を導入することが可能となった。本発明の方法を利用することにより、遺伝子治療等を行う際に、効率的に中枢神経系組織を含む神経細胞へ遺伝子を導入することが可能となった。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS リトアニア	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BF ベルギー	GE ジョージア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ベルギー	GH ガナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BH バ레인	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ブラジル	GN ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
CC 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NE オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

## 明細書

### 神経細胞用(－)鎖RNAウイルスベクター

#### 技術分野

本発明は、ウイルスベクター、詳しくは(－)鎖RNAウイルスベクターを用いることを特徴とする、神経細胞に対する遺伝子治療等に用いられる遺伝子導入法に関する。

#### 背景技術

ヒトや動物に対する遺伝子治療において、高い効率で標的器官や標的細胞へ遺伝子が導入できる系を開発することは極めて重要な課題である。遺伝子を導入するために用いられる方法には、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、陽イオンリボソーム法、エレクトロポレーション法などがあり、特にインビボ遺伝子導入法にはウイルスによる導入法、リボソームによる導入法、および直接導入法が含まれる。中でも、ウイルスの遺伝子を組換えることにより得られる「ウイルスベクター」を用いて行われる遺伝子導入は、導入が容易で効率が高いために、遺伝子治療を含む細胞への遺伝子導入に極めて有用である。

現在よく用いられるウイルスベクターには、レトロウイルスベクター、ヘルペスシンプレックスウイルス(HSV)ベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)などがある。とりわけ、MRI、PETなどを利用した脳機能解析が進むに伴って、非分裂細胞である神経細胞へ効率よく感染し、導入遺伝子を高発現させることができるベクターが求められるようになり、アデノウイルスベクター、ヘルペスシンプレックスウイルス(HSV)ベクター、AAV、HIVなどが注目されるようになった。

HSVは末梢神経系の神経節(ganglion)に遺伝子を導入することができる

報告されているが、発現量の点で問題が残されている(Gene Therapy, 1995, 2:209-217)。HIVも神経細胞へ感染することが確認されている(Nature Biotechnology, 1997, 15:871-875)が、ウイルスゲノムが挿入される染色体上の位置が予測できないため、挿入により正常遺伝子が損傷を受けたり、癌遺伝子を活性化したり、目的遺伝子が過剰発現したり発現が抑制されたりする可能性を否定できない。

AAVはパーキンソン病(Exp.Neurol., 1997, 144:147-156)およびムコ多糖欠損症VII型(ASGT meeting, 1998, 演題番号692)において、脳治療に使用されているが、パーキンソン病では、導入遺伝子が黒質にうまく運ばれないことが、またムコ多糖欠損症VII型においては脳内での発現が十分でないことが報告されている。

アデノウイルスは、現在最も頻繁に使用されており、海馬錐体細胞層に遺伝子導入が可能であると報告されている(Nature Medicine, 1997, 3:997-1004)。しかし、アデノウイルスには細胞毒性があり、抗原性が高いという欠点がある。

一方、センダイウイルス等の(－)鎖RNAウイルスは染色体に挿入されることがないため、癌遺伝子等を活性化することはない。さらにRNAウイルスであるため、感染後からタンパク質発現までの時間が短く、またアデノウイルスと比較しても、はるかに高い導入遺伝子産物の発現量が得られるなどの利点を有している。

### 発明の開示

本発明は、神経細胞の遺伝子治療等に有用な、(－)鎖RNAウイルスベクターを用いた核酸の導入方法を提供することを課題とする。

本発明者らはまず、(－)鎖RNAウイルスの代表格であり、安全性や利便性の点からベクターとして遺伝子治療において有用であるセンダイウイルスを用いて種々の外来遺伝子を有する組換え体を製造し、これらの組換え体を利用して神経細胞や脳組織への外来遺伝子の導入を行った。その結果、これらの組換え体を利用することにより、効率よく外来遺伝子を神経細胞および脳組織に導入し得ることを見出した。さらに、本発明のウイルスベクターを用いると、極めて高いレベルで

導入した外来遺伝子の発現が得られることを見出した。

また、脳内へ導入された本発明のウイルスベクターは増殖を繰り返すことはなく、外来遺伝子を一定期間発現した後、発現が減少した。さらに、本発明のウイルスベクターを用いて、 $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損マウスの脳内へ遺伝子治療を実施したところ、該マウスの症状が改善された。このため、本発明者らは、調製したウイルスベクターが、導入した外来遺伝子の発現量を調節することが必要な神経性疾患の遺伝子治療において、効果的に機能し得ることを見出した。

また、FGF遺伝子を持つ本発明のウイルスベクターをスナネズミまたはマウス脳室内へ投与したところ、ベクターが上衣細胞に感染し、摂食の減少と体重の減少が観察された。上衣細胞は脳と脳室を区切る細胞層であり、第3脳室では脳脊髄液と視床下部神経核とが密接な相互作用を行っている。本発明のベクターは上衣細胞に効率的に感染できるため、本発明のベクターを用いて分泌蛋白質を脳室で発現させ、視床下部神経核（摂食中枢、満腹中枢など）へ作用させることが可能となる。また、スナネズミを用いた虚血モデルで、増殖因子発現ウイルスベクターを海馬実質細胞に導入することにより、細胞の傷害が有意に軽減されることが判明し、本発明のベクターが脳虚血による細胞脱落死防御のために有用であることが示された。これらのことから、本発明のベクターは、さまざまな治療における脳への遺伝子導入用ベクターとして有用であることが示された。

即ち、本発明は、

- (1) (一)鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を神経細胞へ接触させる工程を含む、神経細胞へ核酸を導入するための方法、
- (2) 神経細胞が中枢神経系の細胞である、(1)に記載の方法、
- (3) 中枢神経系の細胞が脳室上衣細胞である、(2)に記載の方法、
- (4) 中枢神経系の細胞が海馬領域の細胞である、(2)に記載の方法、
- (5) (一)鎖RNAウイルスベクターに含まれる核酸が外来遺伝子を含む、(1)から(4)のいずれかに記載の方法、

- (6) 外来遺伝子を一過的に発現させる、(5)に記載の方法、
- (7) 外来遺伝子が分泌タンパク質をコードする、(5)に記載の方法、
- (8) タンパク質が、視床下部神経核に作用するタンパク質である、(7)に記載の方法、
- (9) タンパク質が、脳虚血保護作用を有するタンパク質である、(7)に記載の方法、
- (10) 外来遺伝子が、FGF-1、FGF-5、NGF、CNTF、BDNF、GDNF、p35、CrmA、ILP、bcl-2、ORP 150からなる群より選択される遺伝子である、(5)に記載の方法、
- (11) FGF-1またはFGF-5を外来遺伝子として含む(－)鎖RNAウイルスベクターの投与により、動物の摂食行動を制御する方法、
- (12) FGF-1またはFGF-5を外来遺伝子として含む(－)鎖RNAウイルスベクターの投与により、動物の血糖値を制御する方法、
- (13) (－)鎖RNAウイルスがパラミクソウイルス科に属するウイルスである、(1)から(12)のいずれかに記載の方法、
- (14) パラミクソウイルス科に属するウイルスがセンダイウイルスである、(13)に記載の方法、
- (15) (1)から(14)のいずれかに記載の方法により、神経細胞へ核酸を導入するために用いられる、(－)鎖RNAウイルスベクター、に関する。

本発明において、「(－)鎖RNAウイルスベクター」とは、(－)鎖RNAウイルスに由来し、感染力を有する複合体を含む。ここで「感染力」とは、本明細書においては、複合体が細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、細胞内に複合体内部の核酸等を導入することのできる能力のことを言う。

本発明において、(－)鎖RNAウイルスベクターは、例えば(－)鎖RNAウイルスを材料に用いて製造することができる。材料となるウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニュー

カッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛疫ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス科(rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular S)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が挙げられる。

例えば、センダイウイルスを用いる場合、ウイルスが自律的に複製するためには、NP、P/CおよびL遺伝子から作られるタンパク質群が必要だと考えられているが、該タンパク質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要はない。例えば、本発明のベクターを、該タンパク質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞を用いて製造し、該宿主細胞から該タンパク質群が供給されてもよい。また、これらのタンパク質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでもなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、例えばセンダイウイルスを用いる場合、伝播力を有するためには、M、FおよびHN遺伝子から作られるタンパク質群が必要だと考えられているが、該タンパク質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要はない。例えば、本発明のベクターを、該タンパク質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞を用いて製造し、該宿主細胞から該タンパク質群が供給されてもよい。また、これらのタンパク質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでもなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

外来遺伝子を神経細胞へ導入するには、外来遺伝子をウイルスゲノムに挿入した組換えウイルスゲノムを含む複合体を作製して用いることができる。組換えウ

ウイルスゲノムを含む複合体は、前記のいずれかのウイルスまたは組換え体ウイルスのcDNAを改変したものを試験管内または細胞内で転写させ、ウイルスを再構成させることによって得ることができる。このようなウイルス再構成は、既に開発されている（国際公開97/16539号参照）。

また、完全なセンダイウイルスゲノムではなくても、DI分子(J.Virol. 68,8413-8417,1994)などの不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も複合体を構成する成分として用いることが可能である。

センダイウイルスを材料に用いる場合、伝播力に関わるM、F、HN遺伝子の全ての遺伝子が含まれた複合体を使用することができる。しかし通常は、M、F、HN遺伝子の全てが含まれた複合体を脳内へ導入しても、脳内には、センダイウイルスが伝播力を有するために必要なFタンパク質を開裂させるプロテアーゼが存在しないため、ウイルス粒子形成後も伝播力を持たないと考えられる。ここで、「伝播力」とは、「感染や人工的な手法で核酸が細胞内に導入された後、細胞内に存在する該核酸が複製後、感染粒子またはそれに準ずる複合体を形成し、別の細胞に伝播することのできる能力」を意味する。しかし、より安全には、再構成された複合体に含まれるウイルスゲノムから、伝播力に関わる遺伝子を欠失または機能的に不活化させておくことが好ましい。センダイウイルスの場合、伝播力に関わる遺伝子とは、M、F、および／またはHN遺伝子である。このような複合体の再構成法は既に開発されている（国際公開97/16538号参照）。例えばセンダイウイルスにおいて、再構成された複合体に含まれるウイルスゲノムから、Fおよび／またはHN遺伝子を欠失させたゲノムを有するベクターを作ることができる。このようなベクターも、本発明の神経細胞へ核酸を導入するためのベクターに含まれる。

複合体には、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等が含まれていても構わない。組換え体(－)鎖RNAウイルスは、たとえば免疫原性に関与する遺伝子を不活性化したり、RNAの転写効率や複



製効率を高めるために、一部の遺伝子を改変したものでよい。

複合体に含まれるRNAは、適当な部位に外来性遺伝子を挿入することができる。所望のタンパク質を発現させるためには、所望のタンパク質をコードする外来性遺伝子を挿入する。センダイウイルスRNAにおいては、R1配列とR2配列との間に、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830)。挿入した外来性遺伝子の発現量は、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後のRNA塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスRNAにおいては、挿入位置がNP遺伝子に近いほど、挿入された遺伝子の発現量が多いことが知られている。

複合体に含まれるRNAにコードされた外来遺伝子は、この複合体を細胞に感染させることにより発現させることができる。実施例に示すように、センダイウイルスの再構成系を用いて作製した本発明の一態様としての複合体は、種々の神経細胞株に効率よく外来遺伝子を導入できることがわかった。また実施例5に示すように、外来遺伝子として $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を有する本発明の一態様としての複合体は、レトロウイルスベクターを用いた場合よりも有意に高い発現量を示すことがわかった。このような特性を利用して、神経細胞への遺伝子導入に利用することが可能である。また本発明の一態様としての複合体は、実施例6に示すように、脳室内への投与後、1週間前後で発現が弱まるため、一定期間だけの発現が必要な遺伝子治療などに対し有用である。

製造された複合体は、神経細胞へ接触させることによって、またはウイルスベクター産生細胞を直接神経細胞へ接触させることによって、複合体に含まれる核酸などの化合物を神経細胞へ導入することができる。脳内に投与する場合、例えば、麻酔開頭後、頭蓋骨に穴を開け、ガラス針等を用いて投与することができる。複合体には、外来遺伝子を含めることが可能である。外来遺伝子としては、神経細胞特異的遺伝子、アポトーシス抑制遺伝子、その他各種疾患治療用遺伝子など、あらゆる種類の遺伝子が挙げられる。また、特定の遺伝子の機能を阻害する

ようなアンチセンスDNAやリボザイムのような形態をとることも可能である。

例えば、虚血における脳細胞の細胞死は、虚血直後に起こるのではなく、虚血後数日のうちに起こることがわかっている (Neurosci. Lett., 1998, 240:69-72)。従って、このような時の脳細胞の細胞死を防ぐために、bcl-2などの細胞死を抑制する遺伝子を有する本発明の複合体を利用することができる。実際、本発明のベクター投与により、虚血による栄養分の供給停止により脆弱神経細胞の遅発性細胞脱落を防止できるかを調べたところ、FGF-1発現ベクターの投与により細胞の脱落を有意に防ぐことができることが見出された(実施例10)。また、実施例6および8に示すように、本発明の複合体は、脳室内投与によって、上衣細胞および脳室に沿った細胞へ外来遺伝子を導入できる。外来遺伝子に分泌性タンパク質を産生する遺伝子を用いれば、髄液を伝って該タンパク質を、海馬付近を含む脳内に拡散させることも可能である。また、実施例7に示すように、海馬の錐体細胞へ投与し、該細胞で外来遺伝子を発現させることも可能である。また、実施例6および7に示すように、本発明の一態様としての複合体は、脳内への投与後、13日後も神経細胞において発現が認められ、複合体の導入により、細胞死が引き起こされることはなかった。このことは、本発明の複合体が、中枢神経の遺伝子治療に有用であることを示している。例えば、実施例9において、FGF発現ベクターを脳室内へ投与することにより、摂食量を制御し、体重を減少させることができることが示された。FGF-2による体重減少 (Denton, D.A. et al. (1995) Physiol. Behav. 57(4):747-752)、および体重減少に伴う血糖値の低下 (Stephens, T.W. et al. (1995) Nature 377(6549):530-532) が既に報告されており、本発明で見出された体重減少に伴う血糖値の低下が考えられる。

このように、本発明のベクターを用いることにより、上衣細胞を標的にした、ベクターの新しい投与形態が提供された。標的となる細胞としては上衣細胞の他、脳室に沿った細胞、海馬領域の細胞、特に海馬錐体細胞、ニューラルステムセル、哺乳動物の胚由来の神経堤細胞などが挙げられるが、これらに制限されない

。導入する遺伝子としては、これに制限されないが、繊維芽細胞増殖因子、神経成長因子、アポトーシス阻害因子、ヒートショック蛋白質、過酸化水素分解酵素の遺伝子などが挙げられる。具体的には、FGF-1 (J. Biol. Chem. 271 (47), 30263-30271, 1996), FGF-5 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (20), 8022-8026, 1990), NGF (Nature, 302(2), 538-540, 1983), CNTF (Nature, 357 (6), 502-504, 1992), BDNF (EMBO J., 9(8), 2459-2464, 1990), (Genomics, 10 (3), 558-568, 1991), GDNF (J. Neurosci. Res. 41 (2), 279-290, 1995), p35 (J. Virol. 61(7), 2264-2272, 1987), CrmA (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 7698-7702, 1986), ILP (EMBO J. 15(11), 2685-2694, 1996), bcl-2 (Oncogene., 4(11):1331-6, 1989), ORP 150 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 230 (1), 94-99, 1997)などが例示できる。また、本発明のベクターは、DNAチップやDNAアレイを利用した遺伝子の探索に有用であるほか、モデルマウスの簡便な作成と治療薬開発をも可能とするものである。

本発明の複合体の導入が可能な動物としては、ヒト、スナネズミ、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、サルなど全ての哺乳動物が挙げられる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、GFPおよび $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子などの外来遺伝子を含む付加型センダイウイルス(SeV)の構築法を示す図である。NotI部位を付加したプライマー1および、転写開始配終結シグナル(R2)、介在配列(IG)、転写開始配列(R1)配列、およびNotI部位を含むプライマー2を用いて、外来遺伝子のORFをPCRにて増幅し、pUC18/T7HVJRz.DNA(+18)のNotI部位に挿入する。

図2は、GFP遺伝子を有するセンダイウイルス(「GFP-SeV」)を感染させたマウス脳でのGFPの発現を示すマウス脳正額断面図である。

図3は、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を有するセンダイウイルスを感染させた $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損マウスの、感染3日後の側脳室での $\beta$ -グルクロニダーゼ

の発現を示す脳断面図である。

図4は、A： $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を有するセンダイウイルスを感染させた $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損マウスの、感染12日後の側脳室での $\beta$ -グルクロニダーゼの発現（枠で囲った部分）を示す脳断面の切片である。B：Aの隣接切片のLorbacher法による染色像である。

図5は、FGF-1、FGF-5およびGFP発現センダイウイルスをスナネズミ脳室内へ投与したときの、体重の変化を示すグラフである。

図6は、FGF-1、FGF-5およびGFP発現センダイウイルスベクターをマウス脳室内へ投与後の体重変化を示す図である。

図7は、FGF-1、FGF-5およびGFP発現センダイウイルスベクターをマウス脳室内へ投与後の摂餌量変化を示す図である。

図8は、スナネズミの虚血5日後の海馬CA1領域の錐体細胞の遅発性細胞脱落を示す図である。

図9は、FGF-1発現センダイウイルスベクター投与による海馬CA1領域の錐体細胞の遅発性細胞脱落防御を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### 〔実施例1〕 付加型センダイウイルス(SeV)ベクターの作製

SeV転写ユニットpUC18/T7HVJRz.DNA(+18)(Genes Cells,1996,1:569-579)の制限酵素NotI開裂部位に、導入遺伝子に転写開始(R1)と終結(R2)シグナルと介在(IG)配列を付加したNotI断片をPCRにより増幅させ(図1)、pUC18/T7HVJRz.DNA(+18)の制限酵素NotI開裂部位に導入した(図1)。既知の方法(Genes Cells,1996,1:569-579)に従い、LLCMK2細胞および発育鶏卵を用いて上述の各遺伝子を含むウイルスの再構築を行った。その結果、目的の遺伝子を含むウイルスを回収することが

出来た。

【実施例2】 「GFP-SeV」の確立された神経細胞株への感染性の確認

確立された細胞株として、ラット副腎髄質褐色細胞種(PC12)、ヒトのニューロblastoma細胞(IMR-32)およびヒトのグリオblastoma細胞(A172)を用いた。PC12細胞の培養は終濃度5%になるようにウマ血清および仔ウシ血清をそれぞれ添加したDMEM培地により行った。神経突起を伸長させるために神経成長因子(NGF7S)を終濃度が50ng/mlになるように添加した。ヒトのニューロblastoma細胞(IMR-32)の培養には10%仔ウシ血清を含むMEM培地に、終濃度が1mMおよび0.1mMになるようにMEMビルビン酸ナトリウム溶液およびMEM非必須アミノ酸溶液を添加した培地を使用した。ヒトのグリオblastoma細胞(A172)の培養には10%仔ウシ血清を含むMEM培地(高グルコース)を用いた。

PC12への感染実験は、直径6cmプレートに $10^5$ 個の細胞をNGFを含む培地に植え3日間培養し神経突起の伸長した細胞を用いて行った。培地を除去後、細胞をPBSで1回洗浄した。1%ウシ血清アルブミンを含む500 $\mu$ lのPBSに $10^6$  plaque forming unit(p.f.u.)となるように(GFP遺伝子を導入したSeV、以下GFP-SeVと称する)「GFP-SeV」を希釈し細胞に加え、細胞が乾燥しないように20分間ウイルスを感染させた。感染後、プレートに培地を5ml加え、細胞を2日間培養した。培養後、蛍光実体顕微鏡下でGFPの蛍光を観察した。その結果、「GFP-SeV」がPC12細胞に感染し細胞内でGFPの蛍光を発することを確認した。コントロールのGFP遺伝子を保持しないSeV感染細胞および非感染細胞では蛍光を認めることが出来なかった。

IMR-32細胞を直径10cmプレートに $3 \times 10^5$ 個の細胞を所定の培地に植え、1晩培養した。培養後の細胞数を $6 \times 10^5$ 個と見積もり、多重感染度(m.o.i.)が10になるように「GFP-SeV」を1%ウシ血清アルブミンを含む1000 $\mu$ lのPBSに希釈した。ウイルスを20分間感染させ、所定培地で12および36時間培養を行った。蛍光実体顕微鏡下でGFPの蛍光を観察した。12時間後では、「GFP-SeV」感染細胞の細胞体において蛍光が認められた。36時間後には細胞体の他に突起部位においてもGFPの蛍光が

認められた。コントロールのGFP遺伝子を保持しないSeV感染細胞および非感染細胞では蛍光を認めることが出来なかった。

A172細胞においてもIMR-32細胞と同様な方法で感染させた。「GFP-SeV」感染細胞の細胞体において蛍光が認められた。コントロールのGFP遺伝子を保持しないSeV感染細胞および非感染細胞では蛍光を認めることが出来なかった。

「GFP-SeV」は今回用いたいずれの確立された神経細胞株にも感染し、細胞内でGFP遺伝子よりGFPを発現させることに成功した。これによりSeVの初代脳細胞およびインビボ投与での脳細胞への感染の可能性が示唆された。

### 【実施例3】 ラットの初代脳細胞の培養

妊娠18日SDラットをジエチルエーテルにより深麻酔し、腋下動脈放血により安楽死させた。下腹部を95%エタノールで消毒後、開腹し子宮ごと胎児を摘出した。以後の操作は無菌的に氷上で行い、温度指定のない溶液はすべて氷温のものを使用した。丸ピンセットとハサミを用いて子宮から胎児を摘出し、20mlの作業液(DMEM 50%, PBS 50%)入りプレートに移した。胎児を滅菌ガーゼ上に置き、INOX#4ピンセット2本を用いて皮膚頭蓋を正中に沿って切り開き、INOX#7ピンセットを脳組織下面に沿って差入れ、延髄を断ち切りながら脳組織全体をすくい上げて脳を取り出し作業液に入れた。実体顕微鏡下で、メス2本を用いて作業液中の脳を3枚におろし脳幹を分離し海馬、線条体を含む大脳半球2個を丸ピンセットで別の作業液に移した。実体顕微鏡下で、INOX#5ピンセット2本を用いて脳組織表面の髄膜を残さず除去し、洗浄のため丸ピンセットで別の作業液に移した。大脳半球6個を丸ピンセットで保存液(DMEM (5%ウマ血清および5%仔ウシ血清を含む) 90%, DMSO 10%)に入れ、メスで1mm以下に細切した。切断した組織片を1.5ml程度の保存液と共に冷却しておいた凍結用チューブにいれ、フリージングコンテナに格納し、3時間かけ緩速凍結を行い液体窒素に保存した。大脳半球6個分の組織片を液体窒素より取り出し32℃で解凍した。組織片を氷冷した8mlの作業液で2回洗浄した。30秒間静置し上清を除去した。濾過滅菌し氷温冷却したバブリン溶液（

パパイン 1.5U、システイン 0.2mg、ウシ血清アルブミン 0.2mg、グルコース 5mg、DNase 0.1mg/ml)を5ml加え、32°C15分間加温した。5分毎に転倒攪拌した。上清をとり20%仔ウシ血清入り溶液を5ml加えた。沈殿画分に32°Cに加温したパパイン溶液を5ml加え更に15分間加温した。5分毎に転倒攪拌した。上清が十分に濁り、組織片が半透明になったことを確認してからピペッティングを行い組織片をばらばらにした。32°Cに加温しておいた、1回目の上清画分を試料液に加え、あらかじめ32°Cに温めておいた遠心機で遠心(1200rpm、5分間)した。上清を除きDMEM(5%ウマ血清および5%仔ウシ血清を含む)を5ml加え攪拌し細胞をほぐし、前述の条件下で遠心を行った。上清を除き2mlのDMEM(5%ウマ血清および5%仔ウシ血清を含む)を加え攪拌した。細胞数計測を行った結果、細胞数は $5 \times 10^6$  cells/mlであった。ポリエチレンイミンコーティングされたプレート上に得られた初代脳細胞を撚き培養を行った。

〔実施例4〕 SeVの初代脳細胞への感染性の「GFP-SeV」による確認

実施例3により得られた初代脳細胞を直径10cmプレート上で3日間培養した。上清を除去し、「GFP-SeV」を1%ウシ血清アルブミンを含む1000 $\mu$ lのPBSに希釈した試料溶液を加え、ウイルスを20分間感染させた。感染後、プレートにDMEM(5%ウマ血清および5%仔ウシ血清を含む)培地を10ml加え、細胞を2日間培養した。培養後、蛍光実体顕微鏡下でGFPの蛍光を観察した。ほとんどの細胞が蛍光を呈した。すなわち、初代脳細胞にもSeVが感染することが確認された。

〔実施例5〕  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子欠損ヒト線維芽細胞への $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を有するセンダイウイルス(以下「 $\beta$ -glu-SeV」と略する)の感染と $\beta$ -グルクロニダーゼの発現

本発明の実施には、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子欠損ヒト線維芽細胞(以下 $\beta$ -glu欠損線維芽細胞と称する)および正常ヒト線維芽細胞を使用した。

ムコ多糖欠損症VII型はムコ多糖症の1つであり、リソソーム酵素の1つである $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損により引き起こされる。臨床的には多様な症候を呈する。

胎児水腫を伴う重症型から軽症型までであるが、乳児期から発症する重症例が多い。特有な顔貌、肝脾腫、精神運動発達遅滞、骨変形などである。

$\beta$ -グルクロニダーゼがリソソームに運搬されるためには、小胞体およびゴルジ体で糖鎖付加さらにマンノースの6位がリン酸される必要が示唆されている。リソソームに運搬されるとC-末端がプロテオリシスを受ける。

本発明の実施に際して1)「 $\beta$ -glu-SeV」がヒト線維芽細胞に感染するかどうか、2)発現量はどのくらいであるか、3)リソソームに運搬される分子種が存在するかどうかを検定した。

1)  $\beta$ -glu欠損線維芽細胞を6ウェルプレートに細胞数が $10^5$  cells/wellとなるよう調製した。「 $\beta$ -glu-SeV」をm.o.i.が5になるように1%ウシ血清アルブミンを含む100  $\mu$ lのPBS溶液に希釈し、前日より培養した $\beta$ -glu欠損線維芽細胞に1時間ウイルスを感染させた。血清を含まないMEM培地中で、24時間培養した。培養した細胞をホルマリン、アセトン(1:7)混合液で固定した。基質にナフトールAS-BIグルクロニドを用い、基質の分解をpH5.0の酢酸緩衝液中、37°Cで行い、赤色呈色により基質分解を観察した。その結果、「 $\beta$ -glu-SeV」を感染させた $\beta$ -glu欠損線維芽細胞の細胞質が赤く染色された。これは「 $\beta$ -glu-SeV」が $\beta$ -glu欠損線維芽細胞に感染し、導入遺伝子を発現したことを示すものである。

2)  $\beta$ -glu欠損線維芽細胞を6ウェルプレート上で細胞数が $10^5$  cells/wellとなるよう調製した。「 $\beta$ -glu-SeV」をm.o.i.が0.1および1.0になるように1%ウシ血清アルブミンを含む100  $\mu$ lのPBS溶液に希釈し、前日より培養した $\beta$ -glu欠損線維芽細胞に1時間ウイルスを感染させた。血清を含まないMEM培地中で、24時間および48時間培養した。所定の時間培養後、細胞を回収し超音波処理により細胞内画分を調製した。4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-グルクロニドを基質とし、分光蛍光光度計で蛍光強度を測定することにより4-メチルウンベリフェロン(MU)の量を測定した。その結果を表1に示す。表中、発現量は、1mgの細胞内画分タンパク質が1時間に生成する4-メチルウンベリフェロン(MU)の量で表した。



(表 1)

細胞	感染条件	発現量
		(nmol MU/mg 全タンパク質/時)
$\beta$ -glu欠損線維芽細胞	感染なし	53
正常線維芽細胞	感染なし	276
$\beta$ -glu欠損線維芽細胞	$\beta$ -glu-retro	911
$\beta$ -glu欠損線維芽細胞	$\beta$ -glu-SeV(m.o.i.=0.1,24時間)	15,900
$\beta$ -glu欠損線維芽細胞	$\beta$ -glu-SeV(m.o.i.=1.0,24時間)	27,100
$\beta$ -glu欠損線維芽細胞	$\beta$ -glu-SeV(m.o.i.=0.1,48時間)	21,100
$\beta$ -glu欠損線維芽細胞	$\beta$ -glu-SeV(m.o.i.=1.0,48時間)	32,300

表 1 に示すように「 $\beta$ -glu-SeV」感染細胞の発現量は、15,900～32,300(nmol MU/mg 全タンパク質/時)であり、正常線維芽細胞では276、レトロウイルスで $\beta$ -グルクロニダーゼを発現させた場合( $\beta$ -glu-retro)は911であった。SeVが感染細胞中で、導入タンパク質を強く発現させることが判った。

3) 上記2) で得られた画分を「 $\beta$ -glu-SeV」感染 $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損線維芽細胞内画分とした。培養上清画分として培養上清中に含まれるタンパク質を冷却アセトンで沈殿させ回収した。得られた試料を抗ヒト $\beta$ -グルクロニダーゼ抗体を用いたウエスタンブロッティングに供した。その結果、「 $\beta$ -glu-SeV」感染 $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損線維芽細胞内画分には、抗ヒト $\beta$ -グルクロニダーゼ抗体に反応する、高および低分子の2つのタンパク質が認められた。低分子量のバンドは、正常線維芽細胞で抗ヒト $\beta$ -グルクロニダーゼ抗体に反応するタンパク質と同じ分子量のものであり、リソソームに運搬された $\beta$ -グルクロニダーゼのC-末端がプロテオリシスを受けた分子種であると考えられる。高分子タンパク質は正常線維

芽細胞では認められず、「 $\beta$ -glu-SeV」感染 $\beta$ -glu欠損線維芽細胞内および「 $\beta$ -glu-SeV」感染 $\beta$ -glu欠損線維芽細胞上清画分に認められた。上清画分は高分子量のタンパク質のみであった。高分子のタンパク質種は「 $\beta$ -glu-SeV」感染による $\beta$ -グルクロニダーゼ発現が高すぎるために、リソソームへの輸送が追いつかずミクロソーム又は細胞外に分泌されたものと考えられる。あるいは、分子量からみて、糖鎖は付加されているがマンノースの6位がリン酸化されず、リソソームへ輸送されない分子種である可能性も考えられる。

「 $\beta$ -glu-SeV」感染 $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損線維芽細胞内画分に、リソソームへ輸送されると推測されるヒト $\beta$ -グルクロニダーゼを発現させることが出来た。

〔実施例6〕 GFP-SeVの脳室投与による上皮細胞でのGFPの発現

8-10週齢マウスを10倍希釈メンブタール200 $\mu$ lで麻酔した。開頭後ブレグマから1.0mm正中より右横1.5mmの位置に歯科用ドリルで直径1mmの穴を頭蓋骨に開けた。硬膜を除去後、27Gの注射針を用いて深さ1.3mmの位置にGFP-SeVを投与した。投与「GFP-SeV」容量は20~30 $\mu$ lとし、その試料溶液に含まれるウイルス数は $1 \sim 1.5 \times 10^7$  p.f.u.であった。コントロールとしてGFP遺伝子を含まないSeV、PBSを投与した。投与後、3、5、7、10日後に剖検し、脳全体を取り出し脳を正額断に切断した。実体蛍光顕微鏡下でGFPの蛍光を観察した。「GFP-SeV」投与3日後の剖検切開脳において顕著なGFPの蛍光が認められた。その正額断組織の脳室に沿った部位において、鮮明なGFPの蛍光が認められた(図2)。後の実施例8でも述べるが、GFPの蛍光を呈するSeV感染細胞は上皮細胞であると考えられた。感染5、7日後の側脳室にそった細胞も、蛍光を呈した。しかし、7日後の細胞では蛍光の程度はかなり小さくなっていた。10日後には蛍光を呈する脳細胞を認めることが出来なかった。コントロールとしてGFP遺伝子を含まないSeV、PBSを投与したマウス脳においては蛍光を認めることが出来なかった。

〔実施例7〕 定位脳手術脳実質への「GFP-SeV」の投与

本発明の主な目的である神経細胞、特に海馬の錐体細胞へのSeVの感染を調べる

ためには正確に海馬付近にSeVを投与することが求められる。定位脳手術により脳実質にSeVを導入し、SeVの脳実質細胞への感染を調べた。実験動物として1) マウス、2) ラットを用いた。

1) マウスの正中より左右2mm、ブレグマより前方3mmの頭蓋骨の位置に歯科用ドリルで直径1mmの穴を開け、深さ右3.5mm左2.5mmの実質部分位にガラス針を用いて「GFP-SeV」を1.5 $\mu$ l投与した。閉頭3日後に開頭し、GFPの発現を調べた。実質部分でGFPの発現が認められた。エタノール固定後、凍結切片を作製した。エタノール固定後の凍結切片では発色剤の流出によりGFPの蛍光はかなり減衰されたが、蛍光を呈する部位が認められた。内包付近の白質中で、エタノールでミエリタンパク質が溶出した軸索においてGFPの蛍光が認められた。さらに線条体付近と推測される部位の軸索においてもGFPの蛍光が認められた。

この結果、「GFP-SeV」はマウス脳の神経細胞に感染することが示された。

2) ラットには正確なステレオ図があり、正確に海馬CA1領域の錐体細胞付近に「GFP-SeV」を投与出来る。体重170g前後のラットを、麻酔開頭後、正中より左右2mm、インターナル(シグマ)より前方4.5mmの頭蓋骨の位置に歯科用ドリルで直径1mmの穴を開け、深さ右3.5mm左2.5mmの実質部分位にガラス針を用いて「GFP-SeV」を1.5 $\mu$ l投与した。閉頭3日後に開頭し、GFPの発現を調べた。その結果、深さ2.5mm投与で海馬CA1錐体細胞領域でGFPの発現が認められた。海馬付近を蛍光顕微鏡により拡大して観察すると、海馬CA1錐体細胞の細胞体および樹状突起で顕著な蛍光を呈した。投与13日後の錐体細胞でも発現が観察された。投与13日後でも、GFPの発現が錐体細胞の細胞体および樹状突起で認められた。これはSeV感染13日後でも神経細胞死を引起さないことを示すものであり、脳虚血後の細胞脱落死を防御するための遺伝子治療用ベクターとして活用できることを強く示唆するものである。

【実施例8】  $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損マウスの「 $\beta$ -glu-SeV」による遺伝子治療の試み

実施例6で示したようにSeVは脳室投与で上皮細胞に感染することが示唆されたので、「 $\beta$ -glu-SeV」を $\beta$ -グルクロニダーゼ欠損マウス (J.Clin.Invest.,1989, 83:1258-1266) の脳室に投与し、感染細胞より脳脊髄液に $\beta$ -グルクロニダーゼを分泌させ標的細胞に取込ませることによる、症状改善を図る実験を試みた。

ヘテロマウスの交配により得られたマウスの尾の $\beta$ -グルクロニダーゼ活性測定と染色体上の $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子欠損部位のPCR増幅断片の制限酵素NlaIV切断の有無により、得られた個体からホモマウスを選択し今回の実験に供した。投与方法は実施例6に準じて行った。投与3日および12日後に脳を取り出し、凍結切片を作製した。組織での $\beta$ -グルクロニダーゼ活性は実施例5の1)の方法の変法を用いて調べた。図3で示すように脳室に沿って $\beta$ -グルクロニダーゼ発現部位が強く赤色に染め出された。顕微鏡により拡大して観察すると側脳室の上皮細胞で強く $\beta$ -グルクロニダーゼが発現し、しかも細胞外に分泌されていることが確認された。投与12日後切片上(図4)で、側脳室の上皮細胞で発現し分泌された $\beta$ -グルクロニダーゼが、髄液の移動により脳室内に広がり、海馬付近まで到達していることが判った。投与により外見上 $\beta$ -グルクロニダーゼホモマウスの運動能力が少しではあるが向上した。

【実施例9】 FGF-1または5を保持するセンダイウイルスベクター投与による摂食抑制実験 (スナネズミおよびマウスにおける摂食抑制実験)

スナネズミ (体重60-80g)をメンブータルにて麻酔後、脳定位装置に固定、脱髪し、脳正中に沿って開皮した。頭蓋骨のブレグマより1.0mm、正中より右1.5mmの部位を歯科用ドリルを用いて、頭蓋骨下の血管を切らないように開穴した。開穴後ピンセットで硬膜等を除去した。30Gのシリンジ針を用いて、深さ1.0mmの右側脳室にマウスFGF-1-SeV ( $5 \times 10^6$ pfu)、ヒトFGF-5-SeV ( $1 \times 10^7$ pfu) およびGFP-SeV ( $5 \times 10^6$ pfu) を投与した (n=2)。なお、ウイルスの作製は実施例1に順じて行った。体重測定を行い、体重変化を調べた結果、投与翌日より体重減少が認められた(図5)。FGF-1投与群では投与翌日から体重減少を呈し、6日後まで毎日5

%前後の減少が続き6日後の減少率は29.5%となった。投与7日後に最大減少率29.8%を示した。その後体重は増加に転じ、投与20日後には3.5%の減少率にまで回復した。次にFGF-5投与群では体重減少は翌日から認められ、投与5日後に最大減少率21.7%を示し、その後増加に転じ20日後には8.0%の減少率となった。FGF-9投与群でも同様に体重減少は翌日から認められ、投与5日後に最大減少率22.9%を示し、その後増加に転じ20日後には6.4%の減少率となった。コントロールとして投与したGFP-SeV群では、投与の際の影響によるとみられる体重減少が最大5.8%認められるが、FGF投与群に対する減少率は小さくFGFの作用と考えられる体重減少作用が明確に認められた。

スナネズミの系でFGF-1-SeVおよびFGF-5-SeV投与による体重減少が認められたので、さらに詳細な実験をB-6マウス（体重およそ20-22g）を用いて行った。投与部位は右側脳室とし、ブレグマより1.0mm、正中より右横1.5mmの位置に歯科用ドリルで直径1.0mmの穴を開けた。硬膜を除去後、27Gの注射針を用いて深さ1.3mmの位置に試料を投与した。投与試料のFGF-1-SeVはウイルス溶液1 $\mu$ l ( $1 \times 10^6$  pfu) に9 $\mu$ lのPBSを加え、FGF-5-SeVはウイルス溶液2 $\mu$ l ( $2 \times 10^6$  pfu) に8 $\mu$ lのPBSを加え、コントロールのGFP-SeVは1 $\mu$ l ( $1 \times 10^6$  pfu) に9 $\mu$ lのPBSを加えて調整した。投与後2週間の体重変化と摂餌量を測定した。

コントロールとして投与したGFP-SeVでは体重減少は認められず、投与2週間後には投与開始時の体重に比べて7.5%の増加が認められた（図6）。摂餌量においても顕著な変化が認められなかった（図7）。FGF-1-SeV投与の系では投与6日後に平均30.5%の体重減少が認められた（図6）。その後体重は増加に転じ、2週間後には13.5%の体重減少となった。FGF-1投与による摂餌量変化は劇的で投与2日後から6日後にかけて、特に3日後から6日後にかけてはほとんど摂餌が見られなかった（図7）。FGF-5-SeV投与の系では体重減少は認められたが、FGF-1-SeV投与に比べるとその減少率は小さく最大17.9%の減少であった（図6）。これらの体重減少の度合いはスナネズミの系で示した実験結果と同様の傾向を示すもので

ある。FGF-5-SeV投与における体重減少の割合はFGF-1-SeV投与に比べて少ないが、摂餌量の減少ははっきりと認められた（図7）。

実施例の結果にあるように、SeVによる脳室内でのFGFの発現による体重減少効果は最大30%の体重減少を示した。FGFを精製タンパク質の形で脳室内投与することによる体重減少はたかだか7-8%であることを考えると、体重減少率が非常に大きいことが判明した。これらの効果の差は、投与方法の差によるFGFの脳室内での存在量の違いであることが考えられるほか、SeVの上皮細胞への感染による神経細胞への直接作用による可能性も考えられる。しかし、摂食調節に関しては脳では視床下部の神経核による調節が報告されているのみであることを考えると、SeVが上皮細胞に効率良く感染し機能を有するタンパク質を脳室の脳脊髄液中へ分泌し、その分泌タンパク質が視床下部神経核へ効率的に作用しているものと推察できる。視床下部神経組織の一部は血液脳関門のtight junctionを欠失する神経構築があり、末梢循環や脳脊髄液中の液性因子を受容するニューロンが存在することが明らかにされていることから、この推察が正しいであろうと考えられる。

視床下部諸核のうち、摂食及び満腹中枢と考えられている、視床下部腹内側核（ventromedial hypothalamus; VMH）、視床下部外側野（lateral hypothalamic area; LHA）の中に、化学感受性ニューロンが存在し血液や脳脊髄液中に含まれる代謝産物やホルモンに応答しニューロン活動が変化する。これらVMHやLHAニューロンはグルコースに応答するばかりでなく、サイトカインや成長因子なども食欲の調整因子として作用することが明らかにされている。また室傍核（paraventricular nucleus; PVN）も破壊実験から摂食を抑制することが明らかにされており、ここには摂食抑制作用と交感神経活動促進作用を示すcorticotropin releasing hormone (CRH) 産生ニューロンが存在する。また弓状核（arcuate nucleus; ARC）は摂食促進物質のNPYの産生部位であり、ターゲットはPVNであることが示唆されている。本明細書の摂食行動抑制の結果からFGFはこれら神経核に作用したことが予想される。摂食行動に関し旺盛に研究されている脂肪滴を有する成熟脂肪細胞にお

いて発現しているレプチン、さらにNPYなどとの関連に注目しなければならない。

【実施例10】 スナネズミを用いた虚血性細胞脱落防御実験

脳虚血に曝された領域は細胞障害を受け、それが進行すると細胞死に至る。この程度は虚血の程度と時間に依存している。虚血が重度である場合には短時間の間に神経細胞のみならず虚血領域のすべての構成細胞が不可逆的傷害を被り、ネクロシスによる脳梗塞巣が形成される。しかし、重度の虚血ストレスでも持続時間が短い場合や持続時間が長くても虚血レベルが軽度の場合には、虚血領域細胞の虚血の程度による脆弱性が認められる。最も脆弱な細胞は神経細胞であり、ついでオリゴデンドロサイトが挙げられる。アストログリア、ミクログリア、血管内皮細胞は虚血ストレスに対してより抵抗性を示すことが知られている。広範脳虚血モデルを用いた検討から、虚血に対する神経細胞間にも差が認められることが判っており、遅発性神経細胞死が認められる海馬CA1の神経細胞や歯状回門部の神経細胞、後頭部の前庭神経核の神経細胞が最も脆弱な細胞として知られている。遅発性神経細胞死は、エネルギー不全によらない選択的神経細胞死の再現性良好なモデルとなり虚血性神経細胞死の分子機構の解明に大きく寄与している。これらのモデル系を用いた実験では、神経細胞がどのようなカスケードをたどって死ぬのか、そのカスケードをどこで断ち切れれば細胞を保護することができるのか、遅発性神経細胞死は形式としてどこに位置づけられるのか、などの問題をめぐって多くの報告がなされてきた。

実験モデル動物としてはラット、スナネズミ、マウスが用いられることが多い。これら全脳虚血モデルに数分から数十分の一過性虚血を脳全体に加えることにより生じる、海馬、線条体など虚血に脆弱な部分の病態変化の研究や治療が行われている。ラットでは4血管閉塞モデル、低血圧下両側総頸動脈閉塞モデル、スナネズミの両側総頸動脈閉塞モデルなどがよく虚血モデルとして使用されている。本発明者らはスナネズミの両側総頸動脈閉塞モデルを用いて虚血実験を行った。スナネズミの短時間の虚血（5分間）では主として海馬CA1領域の大部分の錐体

細胞死が起こることが知られている。そこで本発明者らは、虚血細胞死を防御可能性遺伝子のSeVへの導入し、それをスナネズミの海馬に投与し、虚血後の細胞脱落を防御することを目的とした実験を行った。

#### <スナネズミでの虚血細胞死モデルの作製>

スナネズミ (gerbil種) の両側総頸動脈閉塞 (5 分間) モデルにより実験を行った。スナネズミの両側総頸動脈を閉塞 (5 分間) することにより、閉塞後3-5 日後に海馬錐体細胞が選択的に脱落する。しかし、この現象はすべてのスナネズミに認められるものではなく、販売会社よりスナネズミを購入し、その中からスクリーニングにより優秀なものを選抜する必要がある。このスクリーニングを行ったスナネズミ (大阪市大解剖学第一教室の前田講師から譲渡) を用いた。

ケタミン麻酔後、開胸し気管の左右にある頸動脈を探しだし、頸動脈に付着する脂肪を除去した。除去後頸動脈をクリップで5分間閉塞した。この際、脳温および体温が低いと神経細胞死率が有意に低下するので、肛門に温度計を入れ体温を37.5℃になるように保温した。5分後クリップを取り外し、再灌流した。5日後にスナネズミを屠殺し、開頭後脳を取り出し、パラフィン切片を作製した。トルイジン染色により神経細胞の様子を確認した。期待通りに海馬CA-1領域で錐体細胞脱落が認められた (図8)。これによりスナネズミでの虚血細胞死モデルを作製することができた。

#### <組換えSeV導入による神経細胞死防御実験>

上記で作製したSeVベクターを用いて神経細胞脱落防御に効果があるかどうかの検証を行う。すなわち、まず虚血前日に右脳にのみにウイルスを導入し、翌日虚血を行い5-6日後に屠殺し海馬錐体細胞の様子を観察する。

#### <海馬へのFGF-1-SeVの導入>

体重が60-80gになったスナネズミを選抜し本実験に供した。メンブタールにて麻酔後、脳定位装置に固定、脱髪し、脳正中に沿って開皮した。プレグマより5mm、正中より右2mmの部位に歯科用ドリルを用いて、頭蓋骨を、頭蓋骨下の血管を切



らないように開穴した。開穴後ピンセットで硬膜等を除去した。深さ1.4mmに位置に投与ガラス針を導入し、2分間放置し0.5-1.0 $\mu$ lのFGF-1センダイウイルス溶液（ウイルス数 $1.0 \times 10^6$  pfu $\sim$   $2.0 \times 10^6$  pfu）を12分間かけて注入し、さらに10分間放置した。針を抜き、縫合を行った。この際ウイルス投与は右脳のみとし、虚血後の神経細胞脱落の判定を右、左脳を比較することにより行った。

#### <虚血操作>

ケタミン麻酔後、開胸し気管の左右にある頸動脈を探しだし、頸動脈に付着する脂肪を除去した。除去後頸動脈をクリップで5分間閉塞した。この際、脳温および体温が低いと神経細胞死率が有意に低下するので、肛門に温度計を入れ体温を37 $^{\circ}$ Cになるように保温した。5分後クリップを取り外し、再灌流した。5-6日後に屠殺した。

#### <パラフィン切片の作製>

屠殺後脳を正額断に厚さ300-500 $\mu$ mに切り、1晩4%パラフォルムアルデヒドに浸した。自動固定包埋装置にかけパラフィン包埋を行った。5 $\mu$ m厚の切片を作製し、脱パラフィン後、免疫組織染色および染色に供した。

#### <免疫組織染色>

FGF-1投与試料切片を作製し、ウイルス抗体、虚血操作効果の判定のために抗b-チューブリン抗体、アストロサイトの動きを調べるために抗GFAP抗体、apoptosisの有無をみるためにapoptag抗体に対する反応を調べた。somaの形状を調べるためにHE染色を行った。その結果を簡略まとめたものが以下のものである（表2）。

(表2)

FGF-1による効果判定	抗体	判定
ウイルスの海馬領域への導入	ウイルス抗体	○
虚血操作効果の判定	抗b-チューブリン抗体	○
somaの形状	HE染色	○
アストロサイトの動き	抗GFAP抗体	○
apoptosisの有無	apoptag	○

海馬CA-1錐体細胞において、HE染色で観察すると虚血なしコントロール試料では神経細胞に変化は認められず、虚血、ウイルス非投与側では錐体細胞の核の凝縮とeosinophilic changeを示す細胞質を持った萎縮状神経細胞が多く、いわゆる虚血性変化を示していた。一方ウイルス投与、虚血側では、少数の変形神経細胞が散在性に認められたが、大半の神経細胞は形態が保持されていた。投与側にはウイルス抗体陽性領域が認められた。ウイルス非投与、虚血側の形態変化を呈する神経細胞の大半はapoptag 染色陽性であるのに対して、ウイルス投与、虚血側では、HE染色でみられたごく少数の形態学的変化を示す細胞のみが陽性で、大半はアポトーシスが抑制されていると考えられた(図9)。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、従来では困難だった中枢神経系組織を含む神経細胞に遺伝子を導入する方法が提供された。本発明の方法を利用することにより、遺伝子治療等を行う際に、効率的に遺伝子を導入することが可能となった。

## 請求の範囲

1. (－)鎖RNAウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を神経細胞へ接触させる工程を含む、神経細胞へ核酸を導入するための方法。
2. 神経細胞が中枢神経系の細胞である、請求の範囲 1 に記載の方法。
3. 中枢神経系の細胞が脳室上皮細胞である、請求の範囲 2 に記載の方法。
4. 中枢神経系の細胞が海馬領域の細胞である、請求の範囲 2 に記載の方法。
5. (－)鎖RNAウイルスベクターに含まれる核酸が外来遺伝子を含む、請求の範囲 1 から 4 のいずれかに記載の方法。
6. 外来遺伝子を一過的に発現させる、請求の範囲 5 に記載の方法。
7. 外来遺伝子が分泌タンパク質をコードする、請求の範囲 5 に記載の方法。
8. タンパク質が、視床下部神経核に作用するタンパク質である、請求の範囲 7 に記載の方法。
9. タンパク質が、脳虚血保護作用を有するタンパク質である、請求の範囲 7 に記載の方法。
10. 外来遺伝子が、FGF-1、FGF-5、NGF、CNTF、BDNF、GDNF、p35、CrmA、ILP、bcl-2、ORP 150からなる群より選択される遺伝子である、請求の範囲 5 に記載の方法。
11. FGF-1またはFGF-5を外来遺伝子として含む(－)鎖RNAウイルスベクターの投与により、動物の摂食行動を制御する方法。
12. FGF-1またはFGF-5を外来遺伝子として含む(－)鎖RNAウイルスベクターの投与により、動物の血糖値を制御する方法。
13. (－)鎖RNAウイルスがバラミクソウイルス科に属するウイルスである、請求の範囲 1 から 12 のいずれかに記載の方法。
14. バラミクソウイルス科に属するウイルスがセンダイウイルスである、請求の範囲 13 に記載の方法。

15. 請求の範囲1から14のいずれかに記載の方法により、神経細胞へ核酸を導入するために用いられる、(－)鎖RNAウイルスベクター。

図 1

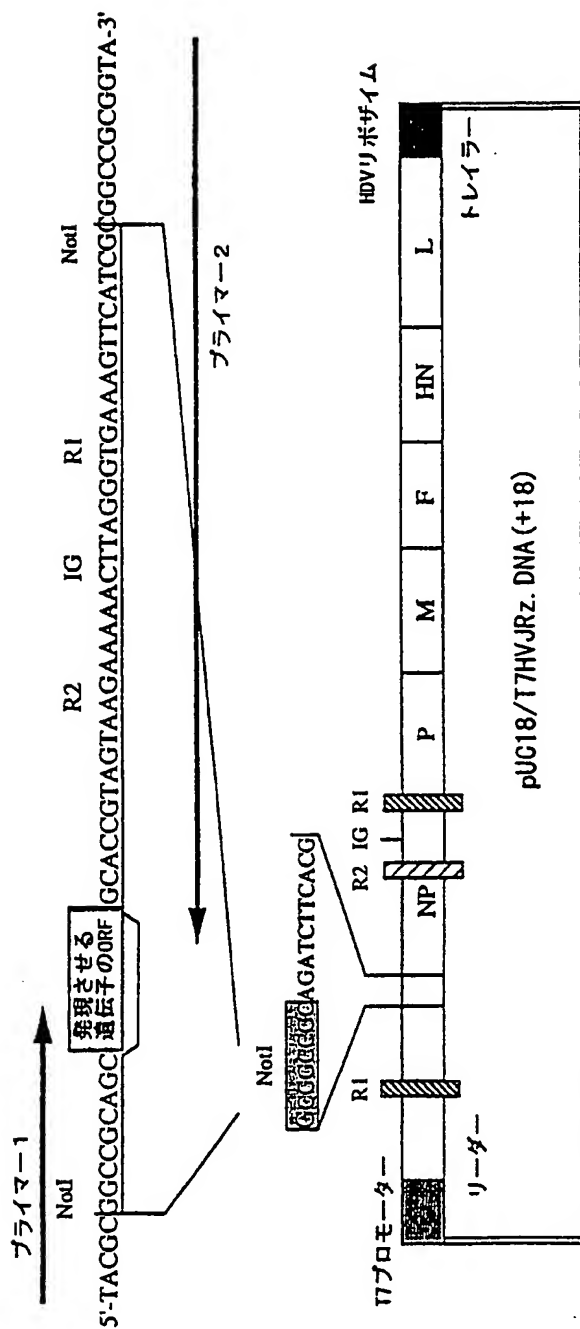


図 2



図 3

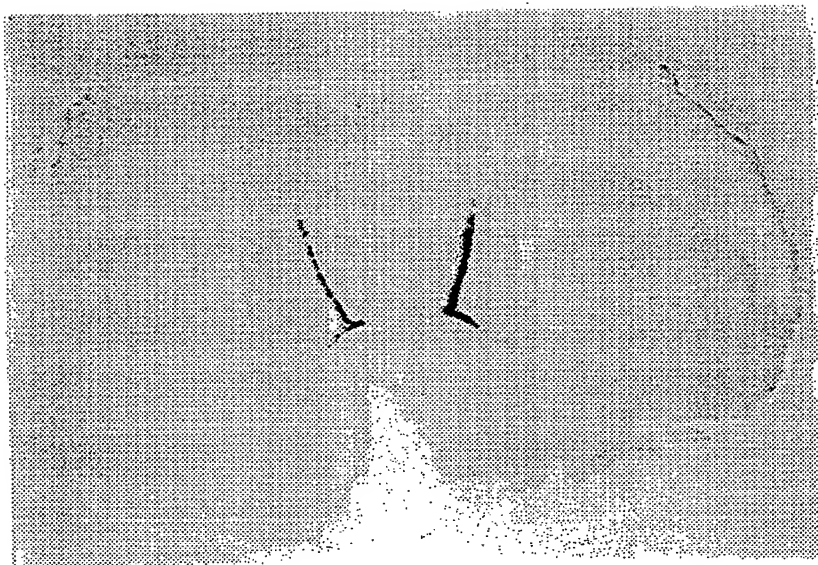
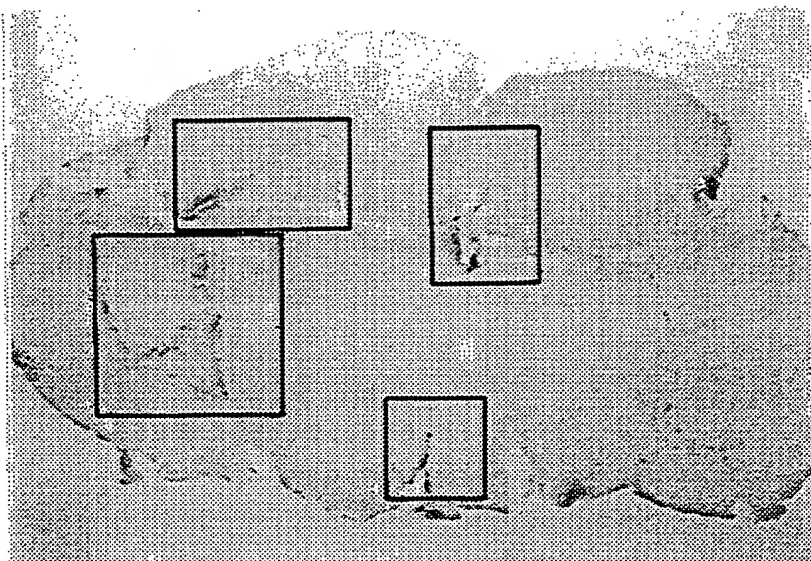
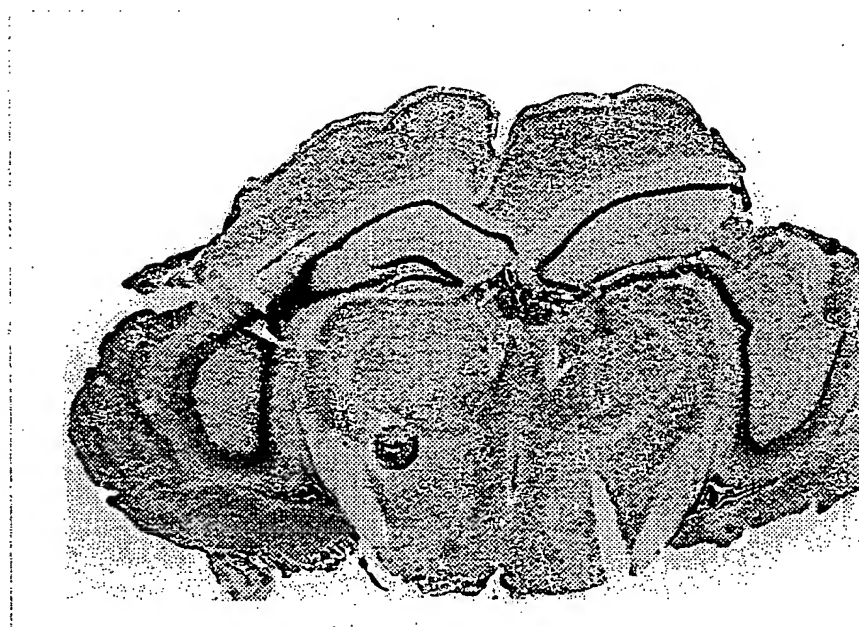


図 4

A



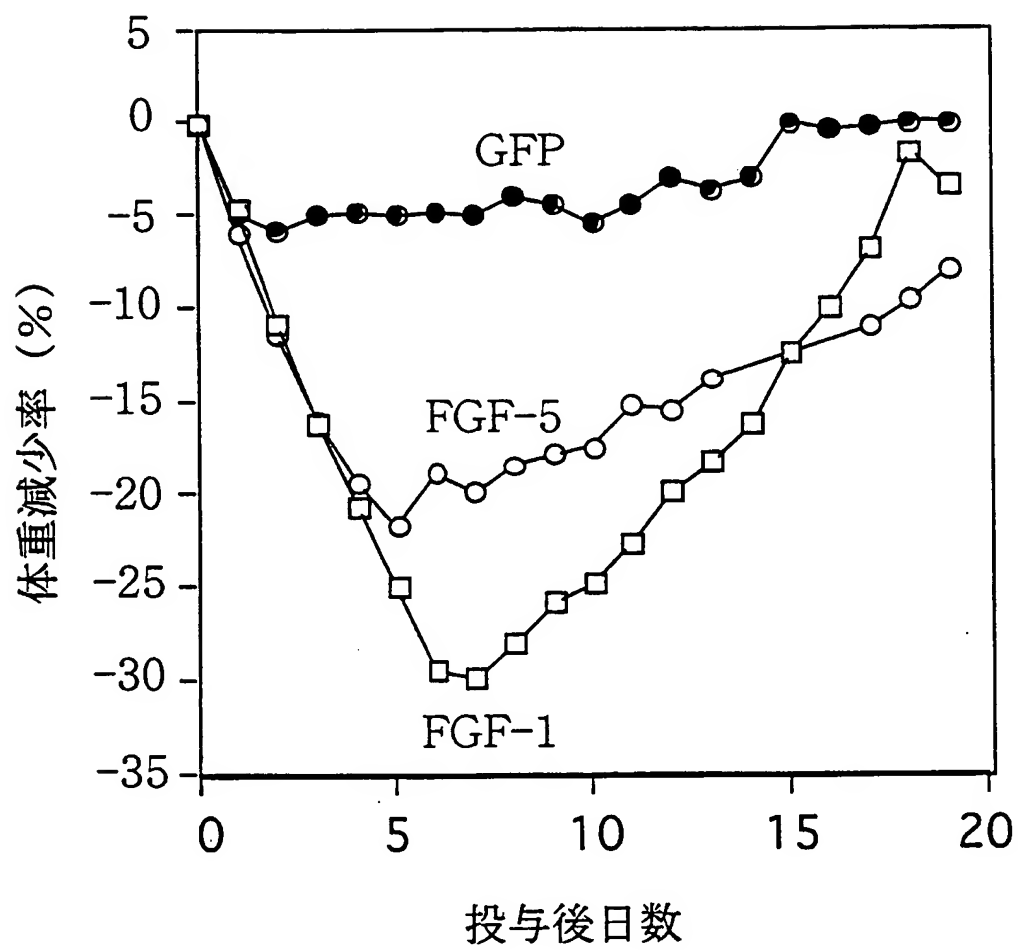
B





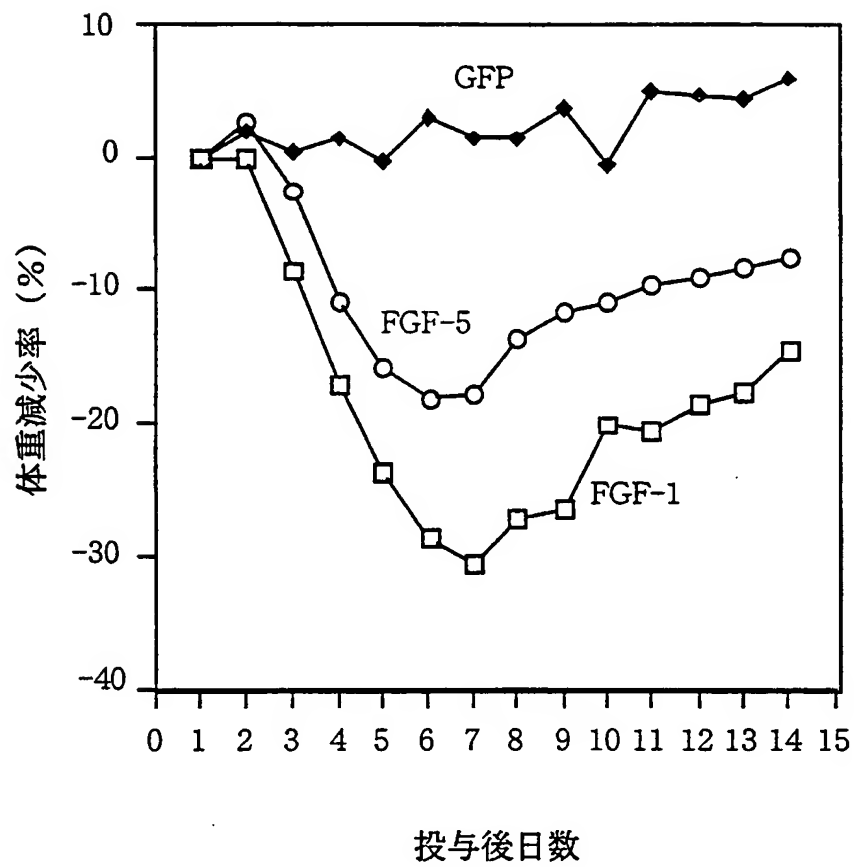
5/9

図5



6 / 9

図 6



7/9

図 7

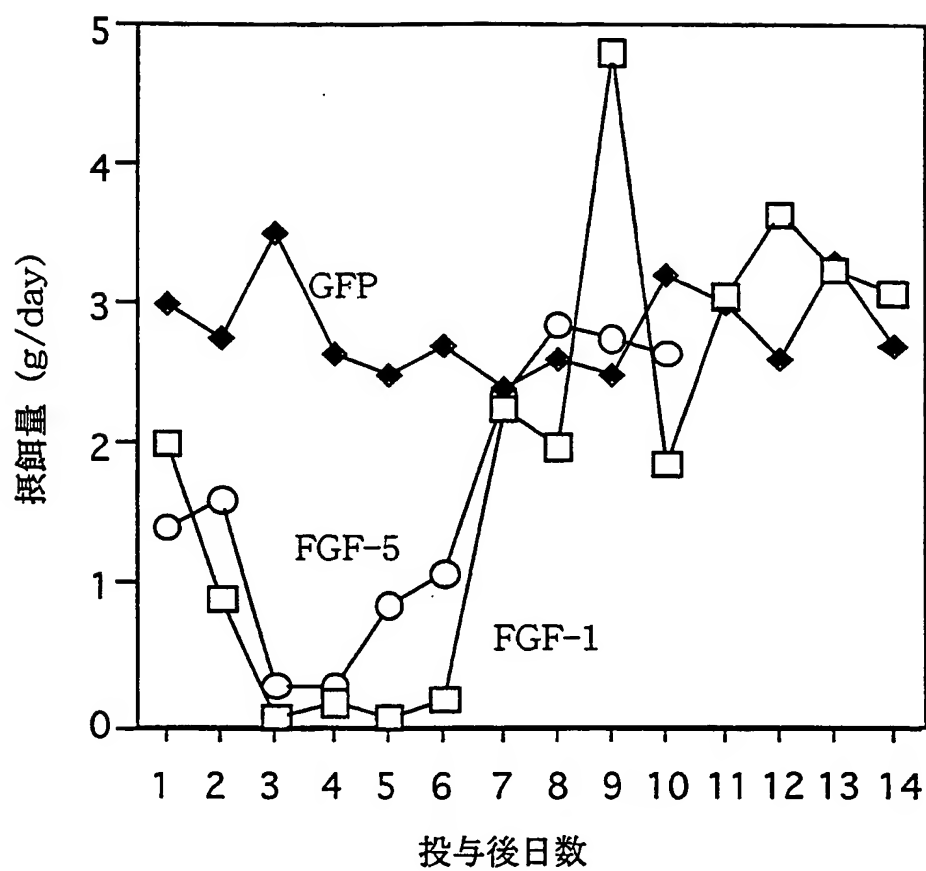
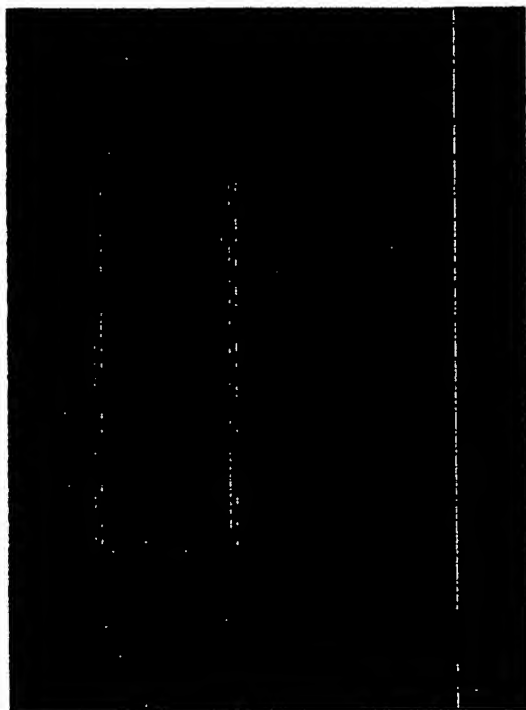
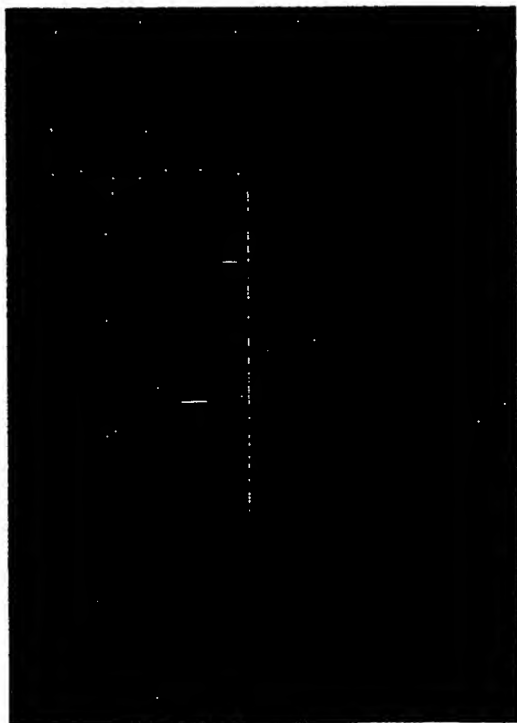


図 8



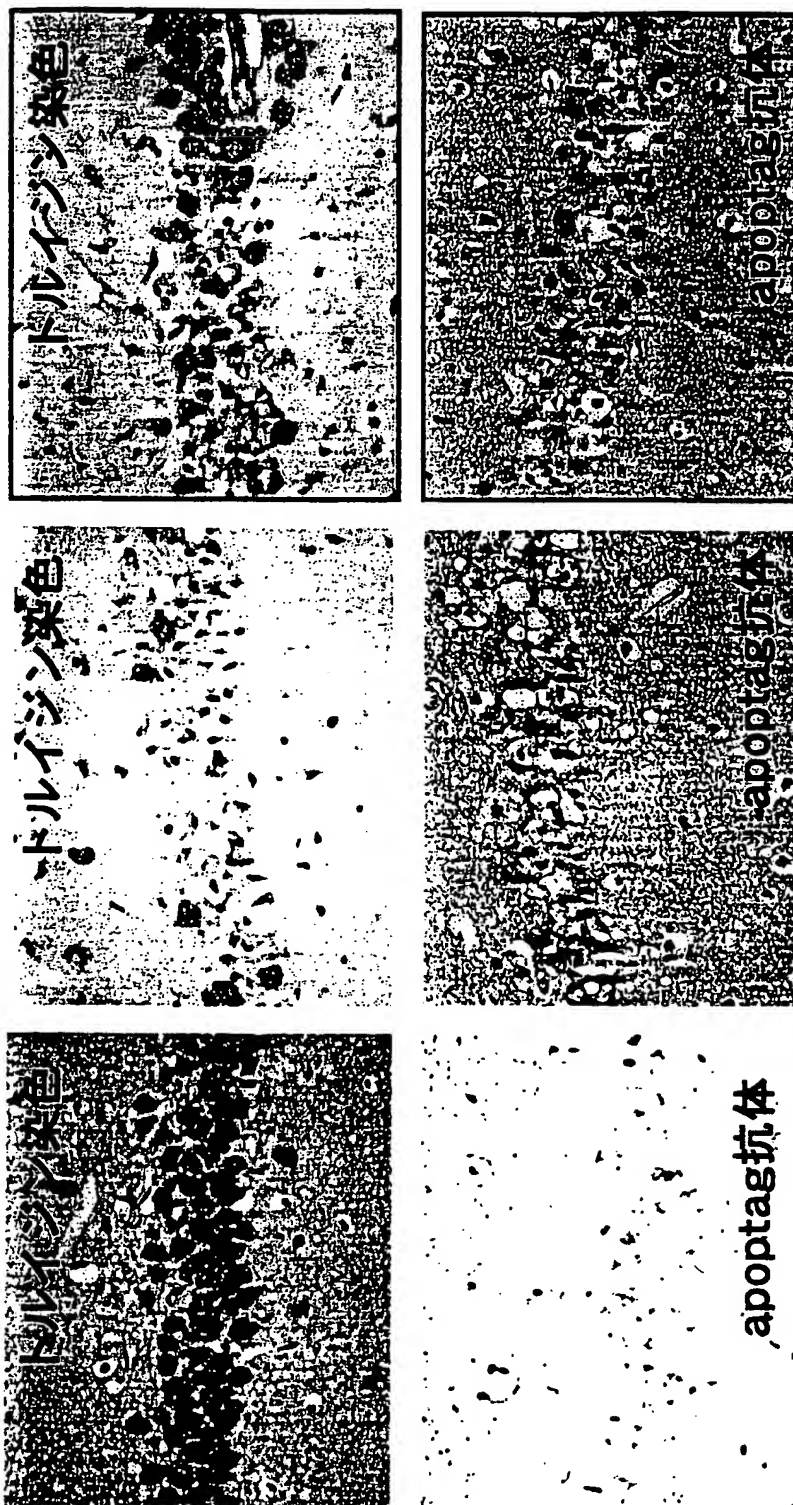
虚血あり



虚血なし

図 9

虚血なし(コントロール)      虚血のみ (左)      組換えSeVベクター+虚血(右)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03552

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.C1 <sup>6</sup> C12N15/86, A61K48/00, A01K67/027, C12N7/00  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>  Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.C1 <sup>6</sup> C12N15/86, A61K48/00, A01K67/027, C12N7/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Neurochemical Research Vol. 18 NO. 10 (1993) Christopher M. de Fiebre et al., "Fusogenic Properties of Sendai Virosome Envelopes in Rat Brain Preparations" P.1089-1094	1-10, 13-15
A	Journal of Controlled Release Vol. 54 NO. 1 (1998) Mahito Nakanishi et al., "Gene transfer vectors based on Sendai virus" P.61-68	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 August, 1999 (31. 08. 99)		Date of mailing of the international search report 14 September, 1999 (14. 09. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N15/86 A61K48/00 A01K67/027 C12N7/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N15/86 A61K48/00 A01K67/027 C12N7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Neurochemical Research Vol. 18 NO. 10 (1993) Christopher M. de Fiebre et al. "Fusogenic Properties of Sendai Virosome Envelopes in Rat Brain Preparations" P. 1089-1094	1-10, 13-15
A	Journal of Controlled Release Vol. 54 NO. 1 (1998) Mahito Nakanishi et al. "Gene transfer vectors based on Sendai virus" P. 61-68	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.08.99

国際調査報告の発送日

14.09.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## DESCRIPTION

## NEGATIVE- SENSE RNA VIRUS VECTOR FOR NERVE CELL

5    Technical Field

The present invention relates to a method of transferring a gene for gene therapy of nerve cells using a virus vector, more specifically, a negative-sense RNA virus vector.

Background Art

10       It is an extremely important object in the gene therapy for humans and animals to develop a system whereby a gene is transferred into target organs and target cells with a high efficiency. Methods for transferring a gene include the calcium phosphate method, DEAE-dextran method, cationic liposome method, electroporation method, etc., and especially methods for transferring a gene *in vivo* include a method using virus or liposome, or a direct transfer method. Among them,  
15       the gene transfer performed using “a virus vector” obtained by recombination of viral gene is extremely useful for the transfer of a gene into cells, for example, for gene therapy because of easy transfer procedure and its high transfer efficiency.

Virus vectors commonly used at present in gene therapy include retrovirus vector, herpes simplex virus (HSV) vector, adenovirus vector, and adeno-associated virus (AAV) vector, etc.  
20       In particular, along with the recent progress in analysis of brain functions using MRI and PET, there has been an increased demand for vectors capable of efficiently infecting non-dividing nerve cells and mediating a high level transgene expression in the infected cells. Therefore, adenoviral vector, herpes simplex viral vector, AAV, HIV, etc. have received considerable attention.

25       Although HSV has been reported to be capable of transferring a gene into ganglions in the peripheral nervous system, a problem remains on the amount of its expression (Gene Therapy, 1995, 2: 209-217). HIV infection of nerve cells has also been confirmed (Nature Biotechnology, 1997, 15: 871-875). Since the chromosomal position into which the HIV genome is inserted is hardly predictable, there are possibilities of damaging a normal gene, activating a cancer gene,  
30       and inducing excessive or suppressed expression of a desired gene.

AAV has been used for the brain treatment in Parkinson's disease (Exp. Neurol., 1997, 144: 147-156) and mucopolysaccharidosis type VII (ASGT meeting, 1998, Abstract No. 692). However, there have been reported an incomplete transfer of the introduced gene into the substantia nigra in Parkinson's disease and its insufficient expression in the brain in  
35       mucopolysaccharidosis type VII.

Adenovirus has been most commonly used at present, and reported to be capable of transferring a gene into the pyramidal cell layer of hippocampus (Nature Medicine, 1997, 3:



997-1004). However, adenovirus has drawbacks, such as cytotoxicity and high immunogenicity.

On the other hand, since negative-sense RNA viruses, such as Sendai virus, are not integrated into chromosomes, they do not activate cancer genes. Furthermore, since Sendai virus is an RNA virus, it has advantages, such as protein expression in short time after infection and an extremely higher level expression of the transgene product compared with Adenovirus.

### Disclosure of the Invention

It is an objective of this invention to provide a method for transferring nucleic acid using a negative-sense RNA viral vector. This method is useful for gene therapy of nerve cells, etc.

The present inventors first prepared recombinant viruses carrying various foreign genes, using Sendai virus, a typical negative-sense RNA virus and useful as a vector for gene therapy because of its safety and convenience. Subsequently, these recombinants were used to transfer the foreign genes into nerve cells, brain tissues, etc. As a result, the inventors found that the use of these recombinants enabled an efficient transfer of foreign genes into nerve cells and brain tissues. Furthermore, they found that the use of viral vectors of this invention led to high level expression of foreign genes introduced.

In addition, viral vectors of this invention transferred into the brain exhibited the limited proliferation. In other words, the expression of the vectors was reduced after a certain period of foreign gene expression. Furthermore, the gene therapy using a viral vector of this invention was applied to the brain of a  $\beta$ -glucuronidase-deficient mouse, which improved the symptoms of said mouse. Thus, the present inventors discovered that the viral vectors prepared could efficiently function in gene therapy of neuropathy where the therapy requires regulation of transgene expression.

The intraventricular administration of a viral vector of this invention carrying an FGF gene to jirds or mice resulted in the vector infection of ependymal cells and the decrease of the food intake and body weight in the animals. Ependymal cells form a cell layer that separates the brain from ventricles, and in the third ventricle the cerebrospinal fluid and hypothalamic nuclei intimately interact. Since vectors of this invention can efficiently infect ependymal cells, they can be used to express a secretory protein in the ventricle so that the protein acts on hypothalamic nuclei (feeding center, satiety center, etc.). In addition, in an ischemic model using jirds, it has been revealed that the cell injury is significantly reduced by introducing a viral vector for a growth factor expression into the hippocampus parenchymal cells, indicating a usefulness of the vector of this invention for preventing the cell death due to cell exfoliation in brain ischemia. These facts have indicated that vectors of this invention are useful as vectors for transfer of gene into the brain in various medical treatments.

The present invention relates to:

(1) A method for transferring nucleic acid into nerve cells, comprising a step of contacting the nerve cells with a negative-sense RNA viral vector or cells comprising said vector;

(2) A method of (1), wherein said nerve cells are the central nervous system cells;

5 (3) A method of (2), wherein said central nervous system cells are ventricular ependymal cells;

(4) A method of (2), wherein said central nervous system cells are hippocampus cells;

(5) A method of any one of (1) to (4), wherein nucleic acid contained in the negative-sense RNA viral vector comprises a foreign gene;

10 (6) A method of (5), further comprising allowing to transiently express said foreign gene;

(7) A method of (5), wherein said foreign gene encodes a secretory protein;

(8) A method of (7), wherein said protein acts on the hypothalamic nuclei;

(9) A method of (7), wherein said protein is capable of protecting the brain from ischemia;

15 (10) A method of (5), wherein said foreign gene is selected from the group consisting of FGF-1, FGF-5, NGF, CNTF, BDNF, GDNF, p35, CrmA, ILP, bc1-2 and ORF 150;

(11) A method for controlling the feeding behavior of animals, the method comprising administering a negative-sense RNA viral vector comprising FGF-1 or FGF-5 as a foreign gene to animals;

20 (12) A method for controlling the blood sugar level of animals, the method comprising administering a negative-sense RNA viral vector comprising FGF-1 or FGF-5 as a foreign gene to animals;

(13) A method of any one of (1) to (12), wherein said negative-sense RNA virus belongs to the Paramyxoviridae family;

25 (14) A method of (13) wherein said virus belonging to the Paramyxoviridae family is Sendai virus; and

(15) A negative-sense RNA viral vector used for transferring nucleic acid into nerve cells by the method of any one of (1) to (14).

30 In this invention, "negative-sense RNA viral vectors" include a complex that is derived from a negative-sense RNA virus and has the infectivity. Herein, "infectivity" means the "capability of a complex to transfer its nucleic acid or other substances inside thereof into a cell through its ability to adhere and fuse to the cell membrane".

In this invention, a negative-sense RNA viral vector can be prepared by using, for example, a negative-sense RNA virus as a starting material. Viruses used as starting materials are  
35 exemplified by, for example, viruses belonging to the Paramyxoviridae such as Sendai virus, Newcastle disease virus, mumps virus, measles virus, RS virus (Respiratory syncytial virus), rinderpest virus and distemper virus; viruses belonging to the Orthomyxoviridae such as

influenza virus; viruses belonging to the Rhabdoviridae such as vesicular stomatitis virus and rabies virus; etc.

When Sendai virus is used, a group of proteins encoded by three genes, NP, P/C and L, which are thought to be essential for its autonomous replication, are not necessarily required to be encoded by the viral vectors of this invention. For example, the vector of this invention can be produced in the host cells that carry the genes encoding this group of proteins so that these proteins are provided by the host cells. In addition, the amino acid sequences of these proteins are not necessarily identical to those native to the virus. Any mutations can be introduced, or substitutions by homologous genes from other viruses can be used as long as their nucleic acid-transferring activities are equal to or higher than those of the naturally occurring proteins.

Further, when Sendai virus is used, a group of proteins encoded by the M, F and HN genes, which are thought to be essential for the disseminative capability of the virus, are not necessarily required to be encoded by the viral vectors of this invention. For example, the vector of this invention can be produced in the host cells that carry the genes encoding this group of proteins so that these proteins are provided by the host cells. In addition, the amino acid sequences of these proteins are not necessarily identical to those are native to the virus. Any mutations can be introduced into the genes or substitution of the genes by homologous gene from other virus can be used as long as their nucleic acid transferring activities are equal to or higher than that of the naturally occurring proteins.

To transfer a foreign gene into nerve cells, a complex comprising a recombinant viral genome into which a foreign gene is inserted can be prepared and used. The complex comprising a recombinant viral genome can be obtained by means of *in vitro* or *in vivo* transcription of a modified cDNA derived from any of the aforementioned viruses or a recombinant virus thereof followed by reconstitution of the virus. A method for reconstituting a virus has already been developed (see WO97/16539).

In addition, instead of the complete Sendai virus genome, incomplete viruses such as defective interfering particles (DI particles) (J. Virol. 68, 8413-8417, 1994), synthetic oligonucleotides, etc. may also be used as the component to constitute the complex.

When Sendai virus is used as a material, a complex may contain all the three genes, M, F and HF, which are involved in the disseminative capability of the virus. However, in general, even though a complex comprising all the M, F and HN genes is transferred into the brain, the complex presumably fails to exhibit disseminative capability after formation of the viral particles, because of the absence of protease to cleave F protein, a protein essential for the disseminative capability of Sendai virus. Herein, "disseminative capability" means "the ability of nucleic acid, which is transferred into a cell by infection or by employing an artificial technique, to replicate and direct the formation of infectious particles or their equivalent complexes which can disseminate the nucleic acid to other cells". However, to increase the safety, the genes involved

in the disseminative capability of the virus are preferably eliminated or functionally inactivated in the viral genome in the complex. In the case of Sendai virus, genes involved in the disseminative capability of the virus are the M, F and/or HN genes. A reconstitution system of such complexes has been developed (WO97/16538). For example, for Sendai virus, a viral vector comprising a genome from which the F and /or HN genes are deleted can be prepared from the viral genome contained in the reconstituted complex. Such vectors are also included in the vectors of this invention for transferring nucleic acid into nerve cells.

The complex may contain on its envelope surface a factor that is capable of adhering to a specific cell, such as an adhesion factor, ligand, receptor, etc. For example, parts of the genes of a recombinant negative-sense RNA virus can be modified to inactivate the genes related to immunogenicity or to enhance the efficiencies of transcription and replication of RNA.

RNA contained in the complex can incorporate a foreign gene at its appropriate site. To express a desired protein, a foreign gene encoding the protein is incorporated into the RNA. For the Sendai virus RNA, a nucleotide sequence consisting of nucleotides in multiples of six is desirably inserted between the R1 and R2 sequences (Journal of Virology, 1993, Vol. 67, No. 8, pp. 4822-4830). Expression of the foreign gene inserted into the RNA can be regulated via the insertion site of the gene or the RNA sequence in the vicinity of the inserted gene. For example, in the case of Sendai viral RNA, it is known that the nearer to the NP gene the insertion position of the RNA comes, the higher the expression level of the inserted gene becomes.

A foreign gene encoded by the RNA contained in the complex can be expressed by infecting cells with the complex. As shown in the examples below, it has been demonstrated that a complex prepared as one embodiment of this invention by using the reconstitution system of Sendai virus enables an efficient transfer of a foreign gene into various nerve cell strains. As shown in Example 5, it has also been revealed that another embodiment of the complex of this invention in which the  $\beta$ -glucuronidase gene is used as a foreign gene shows a significantly higher expression level than retroviral vectors. Owing to these characteristics, the complex of this invention can be used for transferring genes into nerve cells. Since, one embodiment of the complex of this invention shown in Example 6 decreases its expression about one week after the intraventricular administration, it is useful in such a gene therapy that requires the gene expression of only for a limited period of time.

Nucleic acid or other compounds contained in the complex prepared can be introduced into nerve cells by contacting the complex with nerve cells or by directly contacting the viral vector-producing cells with nerve cells. When the complex is administered into the brain, the administration can be performed, for example, by boring a hole on the cranial bone after craniotomy under anesthesia, followed by injecting the complex using a glass needle or the like material. The complex can contain foreign genes. Foreign genes may include any types of genes, such as the nerve cell-specific gene, apoptosis-suppressing gene, other genes for treating

various type of diseases, etc. Such genes can take the forms of antisense DNA and ribozyme so as to inhibit the function of a specific gene.

For example, it has been revealed that the brain cell death in ischemic tissues does not occur soon after ischemia, but within several days after that (Neurosci. Lett. 1998, 240: 69-72).

5 To prevent the brain cell death in such a case, a complex of this invention comprising a gene responsible for suppression of the cell death, such as bcl-2, etc. can be used. In fact, during the investigation whether administration of the vector of this invention could prevent the delayed exfoliation of fragile nerve cells due to depletion of nutrients caused by ischemia, it was revealed that administration of an FGF-1 expression vector could significantly prevent the cell exfoliation  
10 (Example 10). In addition, as demonstrated in Examples 6 and 8, the complex of this invention can transfer a foreign gene into ependymal cells and cells present along the ventricles via intraventricular administration. Use of a gene expressing a secretory protein as a foreign gene can diffuse the protein through the spinal fluid into the brain including the hippocampal area. As shown in Example 7, it is also possible to express a foreign gene in the pyramidal cells of the  
15 hippocampus by administering a complex of this invention into the cells. As shown in Examples 6 and 7, one embodiment of the complex of this invention was expressed in nerve cells even 13 days after the administration of the complex into the brain. No cell death was caused by the transfer of the complex. These results indicate the usefulness of the complex of this invention for the gene therapy of central nerves. For example, in Example 9, it was  
20 demonstrated that the intraventricular administration of an FGF expression vector could successfully control the amount of food intake and reduce the body weight. Body weight loss attributable to FGF-2 (Denton, D. A. et al. (1995) *Physiol. Behav.* 57 (4): 747-752) and reduction of the blood sugar level accompanied with the body weight loss (Stephens, T. W. et al. (1995) *Nature* 377 (6549): 430-532) were already reported, which coincides with the results obtained in  
25 the present invention that the blood sugar level was reduced associated with the body weight loss.

Thus, the vectors of this invention provides a novel mode of vector administration targeting ependymal cells. In addition to ependymal cells, target cells include, but not limited to, cells present along the ventricles, cells in the hippocampal region, especially hippocampus  
30 pyramidal cells, neural stem cells, neural crest cells derived from mammalian embryos, etc. Genes that can be introduced include, but not limited to, those for fibroblast growth factors, nerve growth factors, apoptosis inhibitors, heat shock proteins, peroxidases, etc. Specific examples of such genes include those for FGF-1 (*J. Biol. Chem.* 271 (47): 30263-30271, 1996), FGF-5 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (20): 8022-8026, 1990), NGF (*Nature*, 302 (2): 538-540, 1983), CNTF (*Nature*, 357 (6): 502-504, 1992), BDNF (*EMBO J.*, 9 (8): 2459-2464, 1990;  
35 *Genomics*, 10 (3): 558-568, 1991), GDNF (*J. Neurosci. Res.* 41 (2): 279-290, 1995), p35 (*J. Virol.* 61 (7): 2264-2272, 1987), CrmA (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 7698-7702, 1986), ILP

(EMBO J., 15 (11): 2685-2694, 1996), bcl-2 (Oncogene., 4 (11): 1331-6, 1989), ORP 150 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 230 (1): 94-99, 1997), etc. Vectors of this invention are useful for not only searching genes by using DNA chips and DNA arrays, but also conveniently preparing model mice as well as developing medicines.

5       Animals into which the complex of this invention can be introduced include all kinds of mammals such as human, jird, mouse, rat, rabbit, cattle, monkey, etc.

#### Brief Description of the Drawings

10       Figure 1 schematically shows a method for constructing the replication competent Sendai virus (SeV) comprising a foreign gene, such as for GFP or  $\beta$ -glucuronidase. Using primer 1, which has a NotI site, and primer 2, which comprises, a transcription termination signal (R2), an intervening sequence (IG), a transcription initiation sequence (R1) and a NotI site, the ORF of a foreign gene is amplified by PCR and inserted into the NotI site of pUC18/T7HVJRz.DNA (+18).

15       Figure 2 is a frontal cross sectional view of the mouse brain showing the expression of GFP in a mouse infected with Sendai virus comprising the GFP gene (GFP-SeV).

      Figure 3 is a cross sectional view of the lateral ventricle showing the expression of  $\beta$ -glucuronidase in a  $\beta$ -glucuronidase-deficient mouse 3 days after the infection with Sendai virus carrying the  $\beta$ -glucuronidase gene.

20       Figure 4A shows a cross sectional view of the lateral ventricle showing the  $\beta$ -glucuronidase expression (framed areas) in the ventricle of a  $\beta$ -glucuronidase-deficient mouse 12 days after the infection with Sendai virus carrying the  $\beta$ -glucuronidase gene. Figure 4B shows the section adjacent to that of Figure 4A stained by Lorbacher method.

25       Figure 5 is a graph showing changes in the body weight of jirds after the intraventricular administration of Sendai virus expressing FGF-1, FGF-5 and GFP.

      Figure 6 is a graph showing changes in the body weight of mice after the intraventricular administration of Sendai virus expressing FGF-1, FGF-5 and GFP.

      Figure 7 is a graph showing changes in the amount of food intake of mice after the intraventricular administration of Sendai viruses expressing FGF-1, FGF-5 and GFP.

30       Figure 8 is micrographs showing the delayed exfoliation of pyramidal cells in the hippocampal CA1 area of a jird 5 days after ischemia.

      Figure 9 is micrographs showing the prevention of delayed exfoliation of pyramidal cells in hippocampal CA1 region after the administration of a FGF-1 expressing Sendai viral vector.

#### Best Mode for Carrying out the Invention

35       The present invention will be explained in detail with reference to examples below, but is not to be construed as being limited thereto.

### Example 1. Preparation of the replication competent Sendai virus (SeV)

A NotI fragment comprising a foreign gene to be transferred, transcription initiation (R1) and termination (R2) signals, and intervening sequence (IG) (Fig. 1) was amplified by PCR and inserted into the NotI cleavage site of SeV transcription unit pUC18/T7HVJRz.DNA (+18) (Genes Cells, 1996, 1: 569-579) (Fig. 1). According to an established method (Genes Cells, 1996, 1: 569-579), using LLCMK2 cells and embryonated chicken eggs, the virus comprising the above-described genes was reconstituted, resulting in the recovery of the virus comprising the desired gene.

### Example 2. Confirmation of infectivity of "GFP-SeV" to established nerve cell lines

As the established cell lines, rat phenochromocytoma (PC12), human neuroblastoma (IMR-32) and human glioblastoma cells (A172) were used. PC12 cells were cultured in a DMEM medium supplemented with horse serum and calf serum to a final concentration of 5% for each serum. To promote neurite outgrowth, a nerve growth factor (NGF7S) was added to the medium to a final concentration of 50 ng/ml. An MEM medium containing 10% calf serum supplemented with an MEM sodium pyruvate solution and MEM non-essential amino acid solution to the final concentrations of 1 mM and 0.1 mM, respectively, was used for the culture of human neuroblastoma cells (IMR-32). Human glioblastoma cells (A172) were cultured in a MEM medium (a high glucose medium) containing 10% calf serum.

$10^5$  cells were plated into a 6-cm dish containing NGF in the medium, incubated for 3 days to induce the neurite outgrowth and then used for PC12 cell infection experiment. After removing the medium, the cells were washed once with PBS. SeV into which a GFP gene is introduced (hereinafter referred to as GFP-SeV) was diluted with 500  $\mu$ l of PBS supplemented with 1% bovine serum albumin to  $10^6$  plaque forming unit (p.f.u.), and was added to the cells to infect GFP-SeV for 20 min under the conditions where the cells were protected from drying. After the infection, the medium (5 ml) was added to the plates, and the cells were cultured for 2 days. After culturing, the cells were examined for GFP fluorescence under a fluorescence stereoscopic microscope. As a result, the infection of PC12 cells with GFP-SeV was confirmed by the GFP fluorescence within the cells. Fluorescence emission could not be observed with the control cells infected with SeV carrying no GFP gene and non-infected cells.

IMR-32 cells ( $3 \times 10^5$  cells) were plated into a 10-cm plate containing a predetermined medium, and cultured overnight. Based on the cell number estimated to be  $6 \times 10^5$  after the culture, GFP-SeV was diluted to m.o.i. (multiplicity of infection) of 10 with 1000  $\mu$ l of PBS containing 1% bovine serum albumin. After the cells were infected with the virus for 20 min, they were cultured in a predetermined medium for 12 or 36 h, and then examined for the GFP fluorescence under a fluorescence stereoscopic microscope. After the culture for 12 h,

fluorescence was observed in the cell body of GFP-SeV-infected cells. After the 36-h culture, GFP fluorescence was observed in the neurite portion in addition to the cell body. Fluorescence was not observed in the control cells infected with SeV carrying no GFP gene as well as non-infected cells.

5 A172 cells were also infected with the virus in a similar manner as that used for IMR-32 cells. Fluorescence was observed in the cell body of GFP-SeV-infected cells, but not in the control cells infected with SeV carrying no GFP gene as well as non-infected cells.

GFP-SeV infected all the established nerve cell strains used in the present study, and succeeded in expressing GFP from the GFP gene within the cells. These results indicated a possibility of the SeV infection of the primary culture of brain cells and of brain cells by *in vivo* administration of the virus.

### Example 3. Culture of the primary rat brain cells

15 An SD rat of 18-day pregnancy was deeply anesthetized with diethyl ether, and euthanized by the exsanguination from the axillary artery. After the abdominal region was disinfected with 95% ethanol, it was subjected to laparotomy to remove the fetuses together with the womb. Subsequent procedures were all performed under the germfree conditions on ice, or in ice-cold solutions unless otherwise stated. Fetuses was removed from the womb using scissors and roundheaded forceps, and transferred to a plate containing 20 ml of an operation solution (50% 20 DMEM and 50% PBS). After the fetuses were placed on a sterilized gauze pad, their scalp and skull were incised along the midline using two pairs of INOX#4 forceps. Subsequently, a pair of INOX#7 forceps was inserted along the undersurface of the brain tissue to scoop up the brain tissue as a whole with the medulla oblongata being cut off, and the tissue was excised and placed in the operation solution. Under a stereoscopic microscope, the brain in the operation solution 25 was filleted into three portions using two scalpels to separate the brain stem, and two pieces of cerebral hemispheres containing the hippocampus and corpus striatum were transferred into another operation solution with roundheaded forceps. Under a stereoscopic microscope, the meninx was completely removed from the surface of the brain tissue using two pairs of INOX#5 forceps, and transferred into another operation solution using roundheaded forceps for washing. 30 Six pieces of cerebral hemispheres were placed into a preservation solution (90% DMEM (containing 5% horse serum and 5% calf serum), and 10% DMSO) with roundheaded forceps, and then they were cut into small pieces less than 1 mm using a scalpel on slides. The tissue pieces thus cut were placed into about 1.5 ml of the preservation solution in a pre-cooled tube, which was stored in a freezing container, frozen slowly over a period of 3 hours, and then stored 35 in liquid nitrogen. The tissue pieces of 6 cerebral hemispheres were taken out from the liquid nitrogen, thawed at 32., washed twice in 8 ml of the operation solution, and allowed to stand for 30 sec, and then the supernatant was removed. To the tissue pieces were added 5 ml of an



ice-cold papain solution (papain 1.5 U, cysteine 0.2 mg, bovine serum albumin 0.2 mg, glucose 5 mg, and DNase 0.1 mg/ml) which had been filtered and sterilized. The mixture was warmed at 32. for 15 min and mixed by inverting the tube every 5 min. The supernatant was separated, and 5 ml of a solution containing 20% calf serum were added. A papain solution (5 ml) preheated to 32. was added to the precipitate fraction, and the resulting mixture was further warmed for 15 min. The mixture was mixed by inverting the tube every 5 minutes. After good turbidity of the supernatant as well as translucence of the tissue pieces were confirmed, the tissue pieces were split by pipetting. The first supernatant fraction preheated to 32. was added to this sample solution, and the resulting mixture was centrifuged in a centrifuge preheated to 32. (at 1200 rpm for 5 min). After removal of the supernatant, 5 ml of DMEM (containing 5% horse serum and 5% calf serum) were added to and mixed with the residue to break the cells up, followed by centrifugation under the above-described conditions. After the removal of supernatant, 2 ml of DMEM (containing 5% horse serum and 5% calf serum) were added to the residue, and the resulting mixture was stirred. As a result of cell counting, the cell number was found to be  $5 \times 10^6$  cells/ml. The primary culture of brain cells thus obtained were seeded on a polyethylene imine-coated plate and cultured.

#### Example 4. Confirmation of infectivity of SeV to the primary culture of brain cells using GFP-SeV

The primary culture of brain cells obtained in Example 3 was cultured in a 10-cm plate for 3 days. After the removal of the supernatant, a sample solution prepared by diluting GFP-SeV in 1000  $\mu$ l of PBS containing 1% bovine serum albumin was added to the culture to infect with the virus for 20 min. After the infection, 10 ml of DMEM medium (containing 5% horse serum and 5% calf serum) was added, and the cells were cultured for 2 days. The cells were then examined for the fluorescence of GFP under a fluorescence stereoscopic microscope. Almost all the cells displayed fluorescence. That is, it was confirmed that SeV infects even the primary culture of brain cells.

#### Example 5. Infection of Sendai virus carrying the $\beta$ -glucuronidase gene (hereinafter abbreviated as $\beta$ -glu-SeV) to human fibroblast cells deficient of the $\beta$ -glucuronidase gene and expression of said enzyme in the cells

For the implementation of this invention, human fibroblast cells deficient of the  $\beta$ -glucuronidase gene (hereinafter abbreviated as  $\beta$ -glu-deficient cell) and human normal fibroblast cells were used.

Mucopolysaccharidosis type VII, one type of mucopolysaccharidosis, is caused by deficiency of  $\beta$ -glucuronidase, and shows a variety of clinical symptoms ranging from a mild case to severe case with fetal hydrops. There are many severe cases showing various symptoms

developed during the infantile period, including characteristic facial feature, splenohepatomegaly, psychomotor retardation, bone deformation, etc.

It has been indicated that, for the intracellular transport of  $\beta$ -glucuronidase to lysosome, the addition of sugar chain to the enzyme molecule and the phosphorylation of the 6-position of the mannose moiety of the enzyme are necessary. On the arrival at lysosome, C-terminus of the enzyme undergoes proteolysis..

Prior to the implementation of this invention,  $\beta$ -glu-SeV was examined for 1) its infectivity to human fibroblast cells, 2) its expression amount, and 3) the presence of its molecular species to be transported to lysosome.

1)  $\beta$ -glu deficient fibroblast cells were prepared so that  $10^5$  cells/well were placed in a 6-well plate.  $\beta$ -glu-SeV was diluted in 100  $\mu$ l of PBS containing 1% bovine serum albumin so that the multiplicity of infection (m.o.i.) became 5, and the overnight-cultured  $\beta$ -glu deficient cells were infected for 1 hour. The cells were cultured in a serum-free MEM medium for 24 h. The cells thus cultured were fixed in a mixture of formalin and acetone (1:7, v/v). With naphthol AS-BI glucuronide as a substrate, the reaction was performed in the acetate buffer, pH 5.0, at 37 $^\circ$ C, and the substrate decomposition was monitored by the red coloration. As a result, the cytoplasm of  $\beta$ -glu deficient cells incubated with " $\beta$ -glu-SeV" was stained red, indicating that  $\beta$ -glu deficient cells were infected with " $\beta$ -glu-SeV" to express the transferred gene.

2)  $\beta$ -glu deficient cells were prepared so that  $10^5$  cells/well were placed in a 6-well plate. " $\beta$ -glu-SeV" was diluted in 100  $\mu$ l of PBS containing 1% bovine serum albumin so that the multiplicity of infection (m.o.i.) became 0.1 and 1.0, and incubated with overnight-cultured  $\beta$ -glu deficient cells for 1 h. The cells were cultured in a serum-free MEM medium for 24 or 48 h. After the incubation for the predetermined period of times, cells were recovered and sonicated to prepare intracellular fractions. With 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide as a substrate, the amount of 4-methylumbelliferone (MU), the enzymatic reaction product, was determined by measuring the fluorescence intensity with a fluorospectrophotometer. The results are shown in Table 1. In this table, the expression amount was represented by the amount of 4-methylumbelliferone (MU) produced by 1 mg of protein in the intracellular fraction in 1 hour.

Table 1

Cell	Infecting condition	Amount of expression (nmol MU/mg total protein/h)
.-glu-deficient fibroblast	No infection	53
Normal fibroblast	No infection	276
.-glu-deficient fibroblast	.-glu-retro	911
.-glu-deficient fibroblast	.-glu-SeV (m.o.i. = 0.1, 24 h)	15,900
.-glu-deficient fibroblast	.-glu-SeV (m.o.i. = 1.0, 24 h)	27,100
.-glu-deficient fibroblast	.-glu-SeV (m.o.i. = 0.1, 24 h)	21,100
.-glu-deficient fibroblast	.-glu-SeV (m.o.i. = 1.0, 24 h)	32,300

As shown in Table 1, the expression amount ranged 15,900-32,300 (nmol MU/mg total protein/h), and 276 for normal fibroblast cells and 911 for the cell expressing .-glucuronidase with a retrovirus (.-glu-retro), indicating that SeV strongly expresses a transgene in the SeV-infected cells.

3) The fractions obtained in 2) were used as the intracellular fraction of “.-glu-SeV”-infected-. -glucuronidase-deficient-fibroblast cells. As the culture supernatant fraction, proteins contained in the culture supernatant were recovered by precipitation with cold acetone. Test samples thus obtained were subjected to Western blot analysis using an anti-human .-glucuronidase antibody. As a result, in the intracellular fraction of “.-glu-SeV”-infected-. -glucuronidase-deficient-fibroblast cells, two types of proteins were identified; one has high molecular weight and another has low molecular weight, and both are reactive with the anti-human .-glucuronidase antibody. The band of the low molecular weight protein corresponds to that of the protein reactive with the anti-human .-glucuronidase antibody in normal fibroblast cells, indicating that it is a molecular species of .-glucuronidase the C-terminus of which has undergone proteolysis after transported to lysosome. The high molecular weight protein was not observed in the normal fibroblast cell, but present in the intracellular and supernatant fractions of .-glu-SeV-infected-. -glucuronidase-deficient- fibroblast cells. The supernatant fraction contained only the high molecular weight protein. This may be due to too high an expression of .-glucuronidase caused by .-glu-SeV infection, in which transport of the high molecular weight protein species to lysosome failed to catch up with such a high enzyme expression, resulting in the secretion of the protein into microsomes or extracellular

space. Alternatively, judging from its molecular weight, the high molecular weight protein may be a molecular species with a sugar chain attached but without the 6-position of mannose moiety being phosphorylated so that it cannot be transported to lysosome.

Thus, the human  $\beta$ -glucuronidase, which is assumed to be transported to lysosome, was able to be expressed in the intracellular fraction of  $\beta$ -glu-SeV-infected- $\beta$ -glucuronidase-deficient-fibroblast cells.

#### Example 6. Expression of GFP in ependymal cells by intraventricular administration of GFP-SeV

Mice of 8-10 weeks old were anesthetized with 200  $\mu$ l of 10-fold diluted Nembutal. After craniotomy, a hole of 1 mm in diameter was bored in the skull at the position 1.0 mm from the bregma and 1.5 mm to the right of the midline with a dental drill. After the removal of the dura, GFP-SeV was administered at the position 1.3 mm deep using a 27 G syringe needle. The dose of GFP-SeV was 20 to 30  $\mu$ l, and the number of the virus contained in the sample solution was estimated  $1 \times 10^7$  p.f.u. to  $1.5 \times 10^7$  p.f.u. Control mice were administered PBS or SeV carrying no GFP gene. Autopsy was performed 3, 5, 7 and 10 days after the administration. A whole brain was removed, and a frontal cross section was made. Under a stereoscopic fluorescence microscope, GFP fluorescence was observed. In the dissected brain autopsied 3 days after the administration of GFP-SeV, the conspicuous GFP fluorescence was observed. At the site along the ventricle of the frontal cross section, distinct fluorescence of GFP was observed (Fig. 2). As described in Example 8 below, SeV-infected cells emitting GFP fluorescence were thought to be ependymal cells. The cells along the lateral ventricle also became fluorescent 5 and 7 days after the infection. However, the fluorescence intensity was significantly decreased in the cells 7 days after the infection, and no fluorescent brain cells could be observed 10 days later. Fluorescence could not be observed in the control mouse brains to which PBS or SeV carrying no GFP gene had been administered as a control.

#### Example 7. Administration of GFP-SeV to brain parenchyma under stereotaxy

To examine the SeV infection of nerve cells, especially pyramidal cells of hippocampus, which is the main object of this invention, precisely targeted administration of SeV to the vicinity of hippocampus is required. Therefore, a stereotaxy was conducted to introduce SeV into the brain parenchyma and the brain parenchyma cells were examined for the infection. As the experimental animals, 1) mouse and 2) rat were used.

1) Two holes of 1 mm in diameter each were bored through the skull at the position 2 mm to the left and right of the midline and 3 mm anterior to the bregma using a dental drill. GFP-SeV (1.5  $\mu$ l each) was administered to the parenchymal portions, 3.5 mm deep on the right side and 2.5 mm deep on the left side, using a glass capillary. The skull was closed, and

surgically opened 3 days later to examine the GFP expression, which was observed in the parenchymal portion. After the fixation with ethanol, frozen tissue slices were prepared. Although GFP fluorescence was significantly reduced in the frozen slices after ethanol fixation due to the outflow of chromophores, fluorescent sites were still observed. In the white matter near the internal capsule, GFP fluorescence was observed on the axon from which myelin protein was eluted with ethanol. Furthermore, GFP fluorescence was also observed in the axon in the area presumed to be the corpus striatum.

These results demonstrated that GFP-SeV was capable of infecting nerve cells of the mouse brain.

2) Since a precise stereograph has already been made for rat, GFP-SeV can be accurately administered to the vicinity of pyramidal cells in the hippocampus CA1 area. A rat weighing about 170 g was anesthetized, and, after craniotomy, two holes of 1 mm in diameter each were bored through the skull at the positions 2 mm to the left and right of the medline and 4.5 mm anterior to the internal (sigma) with a dental drill. GFP-SeV (1.5.1 each) was administered to the parenchymal portions, 3.5 mm deep on the right side and 2.5 mm deep on the left side, using a glass capillary. The skull was closed, and surgically opened 3 days later to examine the GFP expression. As a result, the GFP expression was observed in the hippocampus CA1 pyramidal cell area, where GFP-SeV was administered in 2.5 mm deep. Enlarged view of the region adjacent to the hippocampus by fluorescence microscopy revealed the marked fluorescence in the cell bodies of the hippocampus CA1 pyramidal cells and dendrites. The GFP expression was observed even in the pyramidal cells 13 days after the administration. Even 13 days after the administration of GFP-SeV, the GFP expression was observed in the cell bodies and dendrites of the pyramidal cells. These results demonstrate that SeV infection does not cause the nerve cell death even 13 days after the infection, strongly suggesting the usefulness of SeV as a vector for the gene therapy directed to prevention of the exfoliated cell death following the brain ischemia.

#### Example 8. Gene therapy trial on $\alpha$ -glucuronidase-deficient mice using $\alpha$ -glu-SeV

The results of Example 6 indicates that the ependymal cells are infected with SeV by intraventricular administration. Therefore, the inventors conducted an experiment in which  $\alpha$ -glu-SeV is administered to  $\alpha$ -glucuronidase-deficient mice (J. Clin. Invest., 1989, 83: 1258-1266) to induce secretion of  $\alpha$ -glucuronidase from the infected cells into the cerebrospinal fluid and then to be taken up by target cells so that the symptoms would be improved.

Homozygous mice were selected from mice obtained by breeding heterozygous mice based on the  $\alpha$ -glucuronidase activity in the tail vein blood of the mice and on the presence of the Nla<sup>1</sup> IV cleavage site in the PCR amplification fragments of the  $\alpha$ -glucuronidase gene-deficient site on the chromosomes of the mice, and were used in the present experiment. Administration

of  $\beta$ -glu-SeV was carried out according to the method described in Example 6. The brain was excised 3 or 12 days after the administration to prepare the frozen tissue slices. The  $\beta$ -glucuronidase activity in the tissue was assayed using a modification of the method described in Example 5, 1). As shown in Figure 3, the sites at which  $\beta$ -glucuronidase was expressed were strongly stained red along the ventricles. When magnified by microscopy, the ependymal cells of the lateral ventricle were verified to strongly express  $\beta$ -glucuronidase, which was then secreted from the cells. On the tissue slice prepared 12 days after the administration (Figure 4),  $\beta$ -glucuronidase that had been expressed in and then secreted from the ependymal cells of the lateral ventricle was shown to be diffused into the ventricle with the migration of the spinal fluid to reach the vicinity of the hippocampus. Physical capabilities of the homozygous mice was apparently improved, although slightly, by this administration.

Example 9. Experiments on eating depression caused by administration of the Sendai viral vector carrying FGF-1 or -5 (eating depression experiments in jirds and mice)

Jirds (weighing 60 to 80 g) were anesthetized with Nembutal, fixed to a stereotactic instrument, depilated, and then incised in the scalp along the medline. A hole was bored in the skull at the position 1.0 mm from the bregma and 1.5 mm to the right of the medline using a dental drill with care to avoid damaging the blood vessels under the cranial bone. After drilling the hole, the dura and others were removed with tweezers. Mouse FGF-1-SeV ( $5 \times 10^6$  pfu), human FGF-5-SeV ( $1 \times 10^7$  pfu) and GFP-SeV ( $5 \times 10^6$  pfu) were injected 1.0 mm deep into the right lateral ventricle ( $n = 2$ ) with a 30G syringe needle. The recombinant viruses were prepared according to Example 1. Changes in the body weight were monitored by measuring the weight, and decrease in the body weight was observed from the next day of the administration (Figure 5). In the FGF-1-administered group, the body weight started to decrease from the next day of the administration, and continued to decrease by about 5% everyday till 5 days later, resulting in a 29.5% decrease 6 days later, and the maximum decrease of 29.8% was observed 7 days later. Then, the body weight turned to increase, and was recovered to a 3.5% decrease 20 days after the administration. In the FGF-5 administered group, the body weight started to decrease from the next day, reached the maximum of 21.7% decrease 5 days after the administration, and then turned to increase, being recovered to a 8.0% decrease 20 days later. In the FGF-9 administered group, similar decrease in the body weight was observed from the next day, showed the maximum of 22.9% 5 days after the administration, and then turned to increase, being recovered to a 6.40% decrease 20 days later. In the control group to which GFP-SeV was administered, the maximum of a 5.8% decrease in the body weight, which was presumably caused by the administration itself, was observed. However, the rate of the body weight loss was relatively small as compared with the FGF-administered groups, clearly indicating that FGF affects the body weight loss.

Since the body weight decrease due to the administration of FGF-1-SeV and FGF-5-SeV was observed in jirds, more-detailed study was performed using B-6 mice (weighing about 20-22 g). The right lateral ventricle was selected as the administration site, and a hole of 1.0 mm in diameter was bored in the skull at the position 1.0 mm from the bregma and 1.5 mm to the right of the medline with a dental drill. After the removal of the dura, a sample was administered to the animal in the hole at the depth of 1.3 mm with a 27G-syringe needle. The sample solutions were prepared by adding 9  $\mu$ l, 8  $\mu$ l and 9  $\mu$ l of PBS to 1  $\mu$ l of FGF-1-SeV ( $1 \times 10^6$  pfu), 2  $\mu$ l of FGF-5-SeV ( $2 \times 10^6$  pfu), and 1  $\mu$ l of control GFP-SeV ( $1 \times 10^6$  pfu) solutions, respectively. The body weight and the food intake were monitored for 2 weeks after the viral administration.

The control mice administered with GFP-SeV showed no decrease in the body weight, but showed a 7.5% increase as compared with the weight measured prior to the administration (Figure 6). The amount of the food intake was also not significantly changed (Figure 7). In the FGF-SeV-administered group, an average 30.5% decrease in the body weight was observed 6 days after the administration (Figure 6). Then, the body weight turned to increase, resulting in a 13.5% decrease weight 2 weeks later. The change in the amount of food intake due to the FGF-1 administration was so dramatic that almost no food intake was observed from day 2 to day 6, especially from day 3 to day 6 after the administration (Figure 7). In the FGF-5-SeV administered group, although the decrease in the body weight was also observed, the rate of decrease was smaller as compared with the FGF-1-SeV-administrated group, and a 17.9% decrease at the maximum (Figure 6). The effect on the body weight decrease was in a tendency similar to that obtained in the jird experimental system. Although the effect of the FGF-5-SeV administration on the body weight decrease was smaller than that of the FGF-1-SeV administration, the decrease in the food intake was clearly observed (Figure 7).

As shown in the results of the example, the effect of the intraventricular expression of FGF induced by SeV on the body weight decrease was a 30% decrease at the maximum. Considering that the effect of the intraventricular injection of FGF in the purified protein form on the decrease in the body weight was 7 to 8% at most, the rate of 30% achieved in the present invention was shown to be extremely high. Difference in these effects may be due to the difference in the intraventricular accumulation of FGF depending on the administration methods, but there is another possibility that this difference is due to a direct action of FGF on nerve cells through the SeV infection to ependymal cells. As to the feeding control in the brain, only the control by the nerve nuclei of hypothalamus has been reported. In view of this, it is inferred that SeV efficiently infects ependymal cells to secrete a functional protein into the cerebrospinal fluid in the ventricle, and that said secretory protein efficiently acts on the hypothalamic nerve nuclei to exert the feeding control. This inference would be supported by the facts that a part of the hypothalamic nerve tissue has a nerve construction with the tight junctions of the blood-brain barrier being lost and contains neurons to receive liquid factors in the peripheral circulation and

cerebrospinal fluid.

Among the hypothalamic nuclei, chemosensitive neurons are present in the ventromedial hypothalamus (VMH) and lateral hypothalamic area (LHA), which are thought to be the feeding and satiety centers, and the neuron activity alters in response to metabolic products and hormones contained in blood and cerebrospinal fluid. These VMH and LHA neurons respond to glucose, and certain cytokines and growth factors are also known to function as appetite regulators. In addition, it has been demonstrated that, from the disruption experiment, the paraventricular nucleus (PVN) is also responsible for suppression of food intake. This nucleus has neurons that produce corticotropin releasing hormone (CRH) and shows the eating depression and activation of sympathetic nerve activity. Furthermore, the arcuate nucleus (ARC) is the site to produce NPY, a food intake stimulator, which is suggested to target PVN. The results of the experiments on the control of eating behavior described herein suggest that FGF acted on the nerve nuclei. Attention should be paid on the relation with leptin, which is expressed in mature adipocytes having lipid droplets and has been extensively studied in relation to eating behaviors as well as NPY, etc.

Example 10. Experiment on suppression of ischemic cell exfoliation by using jirds

The area exposed to brain ischemia undergoes cell damage, and is further led to the cell death as the ischemia progresses. The extent of cell death depends on the degree and duration of ischemia. In the case of severe ischemia, not only nerve cells but also all constitutive cells in the ischemic area sustain irreversible injuries in a short period of time, resulting in the formation of brain infarction focus caused by necrosis. However, in the case of severe ischemic stress of short duration, or in the case of slight ischemia of long duration, the cells in the ischemic region become fragile depending on the severity of ischemia. The most fragile cells are nerve cells, and then oligodendrocytes follow. Astroglia, microglia, and vascular endothelial cell have been known to be more resistant to the ischemic stress. From the examination using a diffuse brain ischemia model, it has been known that there are differences in the resistance to ischemic stress among nerve cells. The known most fragile cells include nerve cells of the hippocampus CA1, those of the hilum of dentate gyrus, and those of the vestibular nuclei in the occipital region of head, which show a delayed cell death. The delayed nerve cell death is a good model of selective nerve cell death with high reproducibility independent of the energy insufficiency, contributing a great deal to the elucidation of molecular mechanisms of ischemic cell death. There have been many reports on the experiments using these model systems to examine, for example, what cascade the nerve cells may go through to their death, which step of the cascade is critical to protect the cell, into what type of cell death the delayed nerve cell death is classified, etc.

As the experimental model animals, rats, jirds and mice are often used. These animals



are used to study and treat the pathologic changes in the portions vulnerable to ischemia, such as hippocampus, corpus striatum, etc., induced by causing transient ischemia in the whole brain of the ischemia models for several to several ten minutes. A rat four vessel occlusion model, a rat hypotensive bilateral common carotid artery occlusion model, a bilateral common carotid artery occlusion model of jirds, etc. are frequently used as the ischemia model. The present inventors carried out an ischemia experiment using a bilateral common carotid artery occlusion model of jird. It has been known that in jirds cell death occurs mainly in most of the pyramidal cells in the hippocampal CA1 area when animals are subjected to a short time (5 min) ischemia. Therefore, the present inventors performed an experiment aiming at prevention of the cell exfoliation after ischemia by introducing into SeV a gene capable of preventing the cell death and administering the resulting complex to the hippocampus of jirds.

#### <Preparation of an ischemic cell death model of jird>

Experiments were carried out with a bilateral common carotid artery occlusion (5 min) model of jird (gerbil species). By occluding (for 5 min) the bilateral common carotid artery of a jird, the pyramidal cells of hippocampus are selectively exfoliated 3-5 days after the occlusion. However, since this phenomenon is not commonly observed among jirds, it is necessary to screen jirds excellent as a model animal from those obtained from a commercial source. The jirds selected by the screening (obtained from Instructor Dr. Maeda, Department 1 of Anatomy, Osaka Municipal University) were used for the experiment.

After anesthetized with ketamine, the animals were subjected to thoracotomy to find out the carotid arteries on the left and right sides of the trachea, and fat adhering to the carotid artery was removed. After the fat removal, the carotid arteries were occluded for 5 min with clips. During this procedure, since the rate of nerve cell death is significantly reduced when the brain and body temperatures are low, the animals were kept warm to retain the body temperature at 37.5. being monitored with a thermometer inserted into the anus. The clips were removed 5 min later, and the blood was perfused again. Five days later, the jirds were sacrificed, and, after the craniotomy, the brain was excised to prepare tissue slices in paraffin. Conditions of nerve cells were confirmed by toluidine staining. As expected, the exfoliation of the pyramidal cells was observed in the hippocampal CA-1 area (Figure 8). Thus, the ischemic cell death model of jird has been prepared.

#### <Experiment on prevention of nerve cell death by introduction of the recombinant SeV>

The SeV vector prepared above is used to examine whether the Sev vector is effective for preventing the nerve cell as follows: On the day before ischemia, the virus is introduced into only the right brain of the jirds. Ischemia is applied on the next day, and the animals are sacrificed 5-6 days later to observe the hippocampus pyramidal cells.

#### <Transfer of FGF-1-SeV into hippocampus>

Jirds weighing 60-80 g were selected and used in this experiment. After anesthetized with Nembutal, the animals were fixed to a stereotactic instrument. The brain was then depilated and the scalp was cut open along the midline of the brain. A hole was bored through the skull at the position 5 mm from the bregma and 2 mm to the right of the midline using a dental drill with care not to damage the blood vessels under the cranial bone. After drilling the hole, the dura and others were removed with tweezers. An administration glass needle was inserted into the position at the depth of 1.4 mm, and the animals were allowed to stand for 2 min. Through the glass needle, 0.5 to 1.0  $\mu$ l of an FGF-Sendai virus solution (virus of  $1.0 \times 10^6$  pfu to  $2.0 \times 10^6$  pfu) was injected to the position in a period of 12 min, and the animal was allowed to stand for further 10 min. The needle was removed, and the incision was sewed up. In this procedure, the virus was administered only to the right brain, and the exfoliation of nerve cells after ischemia was determined by comparing the right and left brains.

#### <Ischemic operation>

After anesthetized with ketamine, the animals were subjected to thoracotomy to find out the carotid arteries on the left and right sides of the trachea, and fat adhering to the carotid arteries was removed. After the fat removal, the carotid arteries were occluded for 5 min with clips. During this procedure, since the nerve cell death is significantly reduced when the brain and body temperatures are low, the animals were kept warm to retain at the body temperature at 37.5, being monitored using a thermometer inserted into the anus. The clips were removed 5 min later, and the blood was perfused again. Five to six days later, the animals were sacrificed.

#### <Preparation of paraffin sections>

After the animal was sacrificed, frontal cross sections of the hindbrain were made into 300-500  $\mu$ m thick slices, soaked in 4% paraformaldehyde overnight, and embedded in paraffin with an automatic apparatus for fixation and embedding. The sections (5  $\mu$ m thick) were prepared, deparaffinized, and subjected to immunohistochemical staining and other stainings.

#### <Immunohistochemical staining>

Sections of the FGF-1-administered brain were prepared to examine for the reactivity to an antibody against the virus, to an anti-tubulin antibody (to determine the effect of ischemic operation), to an anti-GFAP antibody (to examine the astrocyte movement), and to an apoptag antibody (to examine the presence of apoptosis). The results are briefly summarized as follows (Table 2).

Table 2

Determinations of the effect of FGF-1	Antibody	Determination
Introduction of the virus into the hippocampal area	anti-virus antibody	.
Determination of the effect of the ischemic operation	Anti-b tubulin antibody	.
Morphology of the soma	HE staining	.
Movement of astrocytes	Anti-GFAP antibody	.
Presence of apoptosis	Apoptag	.

5 In the pyramidal cells of the hippocampal CA-1 region, HE staining did not reveal any  
 changes in the nerve cells in the control sample, which underwent no ischemia. Many of the  
 cells in one side of the brain which underwent ischemia but were not administered with the virus  
 were atrophic nerve cells displaying nuclear condensation in the nucleus and eosinophilic change  
 in the cytoplasm, so-called ischemic changes. In contrast, in the other side of the brain, which  
 underwent ischemia and was administered with the virus, a small number of deformed nerve  
 10 cells were observed to be dispersed, but a majority of the nerve cells retained the original  
 morphology. On the side to which the virus was administered, a region that was positive for the  
 antibody against the virus was observed. In the nerve cells that underwent ischemia but were  
 not administered with the virus, the most of the cells that showed deformation were positive for  
 the apoptag-staining. In contrast, in the cells which underwent ischemia and were administered  
 15 with the virus, only a very few cells that stained with HE and showed the morphological change  
 were positive for the apoptag-staining, indicating that apoptosis was suppressed in the majority  
 of the cells in this side (Figure 9).

### Industrial Applicability

20 The present invention has provided a method for transferring a gene into nerve cells in the  
 tissues including the central nervous tissue, into which transfer of a gene has hitherto been  
 difficult. Use of the method of this invention enables the efficient transfer of a desired gene into  
 the cells in gene therapy, etc.

## CLAIMS

1. A method for transferring nucleic acid into nerve cells, comprising a step of contacting the nerve cells with a negative-sense RNA viral vector or cells comprising said vector.

2. A method of claim 1, wherein said nerve cells are the central nervous system cells.

3. A method of claim 2, wherein said central nervous system cells are ventricular ependymal cells.

4. A method of claim 2, wherein said central nervous system cells are hippocampus cells.

5. A method of any one of claims 1 to 4, wherein nucleic acid contained in the negative-sense RNA viral vector comprises a foreign gene.

6. A method of claim 5, further comprising allowing to transiently express said foreign gene.

7. A method of claim 5, wherein said foreign gene encodes a secretory protein.

8. A method of claim 7, wherein said protein acts on the hypothalamic nuclei.

9. A method of claim 7, wherein said protein is capable of protecting the brain from ischemia.

10. A method of claim 5, wherein said foreign gene is selected from the group consisting of FGF-1, FGF-5, NGF, CNTF, BDNF, GDNF, p35, CrmA, ILP, bcl-2 and ORF 150.

11. A method for controlling the feeding behavior of animals, the method comprising administering a negative-sense RNA viral vector comprising FGF-1 or FGF-5 as a foreign gene to animals.

12. A method for controlling the blood sugar level of animals, the method comprising administering a negative-sense RNA viral vector comprising FGF-1 or FGF-5 as a foreign gene to animals.

13. A method of any one of claims 1 to 12, wherein said negative-sense RNA virus belongs to the Paramyxoviridae family.

14. A method of claim 13 wherein said virus belonging to the Paramyxoviridae family is Sendai virus.

15. A negative-sense RNA viral vector used for transferring nucleic acid into nerve cells by the method of any one of claims 1 to 14.

## ABSTRACT

Use of a negative-sense RNA virus vector has enabled transfer of nucleic acid into nerve cells. The method of this invention can be used for introducing a gene efficiently into nerve  
5 cells including the central nerve tissue in gene therapy, etc.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**